

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Biologická aktivita obsahových látek rostlin V.
Vliv alkaloidů z *Chelidonium majus* L. na acetylcholinesterázu.

(Biological activity of plant metabolites V.
Influence of alkaloids from *Chelidonium majus* L. on
acetylcholinesterase)

Školitel : doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Děkuji panu doc. RNDr. Opletalovi, CSc. za vedení, poskytnutí odborné literatury, materiálů, cenných rad, zkušeností a připomínek při vypracování mé diplomové práce. Dále pak děkuji Mgr. Danielu Jůnovi, PhD. a Ing. Kamilu Kůčovi, PhD. (Univerzita obrany v Brně, Fakulta vojenského zdravotnictví v Hradci Králové) za měření a propracování použité metody.

OBSAH

ZKRATKY.....	4
1. ÚVOD	5
2. CÍL	8
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1. Alzheimerova nemoc (AD)	11
3.1.1. Klinický obraz AD	11
3.1.2. Diagnostika AD	12
3.1.3. Neurobiologické změny	12
3.1.4. Příčiny AD	14
3.1.5. Rizikové faktory AD	14
3.2. Terapie AD	15
3.2.1. Kognitivní farmakoterapie AD.....	16
3.2.1.1. Substituce nedostatkovými neurotransmitery nebo neuromodulátory.....	16
3.2.1.2. Ovlivnění neuronálního metabolismu.....	18
3.2.1.3. Scavengery ROS.....	18
3.2.1.4. Ovlivnění excitotoxicity.....	19
3.2.1.5. Nervové růstové faktory.....	19
3.2.1.6. Protizánětlivé látky, estrogeny, statiny.....	19
3.2.2. Nekognitivní farmakoterapie AD	20
3.3. Inhibitory AChE – přírodní látky.....	20
3.4. Botanický popis	21
3.4.1. Vlastní popis	21
3.4.2. Systematika	22
3.5. Obsahové látky	22
3.6. Farmakologické účinky, využití rostliny v praxi	27
3.6.1. Protinádorové a antivirové působení	27
3.6.2. Hepatotropní a spasmolytické účinky	28
3.6.3. Biologické účinky hlavních obsahových látek	29

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	32
4.1. Všeobecné postupy	33
4.1.1. Destilace a odpařování rozpouštědel	33
4.1.2. Sloupcová chromatografie	33
4.1.3. Tenkovrstvá chromatografie	33
4.1.4. Sušení	33
4.2. Potřeby	33
4.2.1. Rozpouštědla	33
4.2.2. Chemikálie	34
4.2.3. Detekční činidla	34
4.2.4. Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii	35
4.2.5. Chromatografické adsorbenty	35
4.3. Biochemická část	35
4.3.1. Materiál	35
4.3.2. Přístroje	36
4.3.3. Příprava homogenátů	36
4.3.4. Inhibice cholinesteráz	36
4.3.5. Matematické zpracování experimentálních dat	37
4.4. Izolace	37
4.4.1. Materiál	37
4.4.2. Příprava extraktu a jeho čištění	37
4.4.2.1. Výtřepok A z primárního extraktu	38
4.4.2.2. Výtřepok B z primárního extraktu	38
4.4.2.3. Výtřepok J z primárního extraktu	38
4.4.2.4. Výtřepok E z primárního extraktu	38
4.4.2.5. Zbýlý vodný extrakt	39
4.4.2.6. Dělení surového výtřepku A	39
4.4.3. Sloupcová chromatografie výtřepku AC ₁	42
4.4.4. TLC z jednotlivých frakcí z výtřepku A	44
4.4.5. Dělení jednotlivých frakcí	47
4.4.6. Preparativní TLC ML frakce 12	47
4.5. Přehled izolovaných látek	49
4.5.1. Teplota tání a IČ spektrum	49
4.5.2. Výsledky biochemické části	50

5. DISKUSE	51
6. SOUHRN	55
LITERATURA	57

ZKRATKY :

AD	Alzheimerova nemoc
AChE	acetylcholinesteráza
ApoE	apolipoprotein E
BuChE	butyrylcholinesteráza
CCH	civilizační choroba
EtOH	ethanol
CHCl ₃	chloroform
IC ₅₀	koncentrace látky, která snižuje aktivitu enzymu na polovinu
ML	mateční louh
nR	nerozpustný
R	rozpustný
R _F	retenční faktor
ROS	reaktivní formy kyslíku

1. ÚVOD

Od devadesátých let 20.století patří Česká republika mezi země s nejvyšším výskytem civilizačních chorob (CCH) na světě. CCH jsou onemocnění, která postihují stále více lidí v rozvinutých státech. Postupné zhoršování zdraví nejlépe vyjadřuje vzrůst úmrtnosti na kardiovaskulární onemocnění. Od roku 1950 došlo za 36 let k jejímu nárůstu o 72%. To značí roční přírůstek 2% ¹. Tato onemocnění mají kořeny v nesprávných návycích v oblasti životního stylu, nepříznivým stavem životního prostředí, rozvojem techniky a materiálním rozvojem společnosti.

K CCH patří např. diabetes mellitus, obezita, arteriální hypertenze, ateroskleróza, některá nádorová onemocnění, osteoporóza, ale právě i neurodegenerativní onemocnění jako Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova choroba.

Alzheimerova nemoc (AD) je nejčastěji se vyskytující druh demence a trpí jí každý desátý člověk starší 65 let. Z hlediska dědičnosti se vyskytuje ve dvou formách. Familiární forma je forma děděná v rodině z generace na generaci, je velmi vzácná, tvoří 1-5% všech případů AD. Tato forma postihuje člověka obvykle po padesátém roce života. Druhá forma, forma sporadická, se vyskytuje zdánlivě náhodně a představuje naprostou většinu případů. Otázkou je, zda máme všichni stejné riziko onemocnět touto chorobou. Jak je možné, že u někoho se nemoc objeví už po padesátém roce života, zatímco jiní jsou i dlouho po devadesátém ve výborné duševní kondici?

Jednoznačné je, že určité činnosti mozku velmi prospívají. Patří k nim učení se novým věcem, jako např. učit se pracovat s počítačem, navštěvovat galerie a obrazárny. Dále je pak prospěšné luštění křížovek, četba, hraní her náročných na pozornost (jako např. karty, šachy, scrabble), cestování, pěší turistika a mnohé další činnosti.

Naopak jsou známy činnosti, které mozku naprosto neprospívají. Jsou to deprese, protože při trvalém smutku se činnost mozku tlumí. Dále je to alkohol, který způsobuje ve větším množství akutní i chronické poruchy paměti a dalších funkcí mozku. Mozku neprospívá nečinnost a některé druhy běžně používaných léků.

AD je nemoc nevyléčitelná, která bohužel vede ke smrti pacienta. Včasným zahájením léčby a náležitou péčí, nejlépe v domácím prostředí, lze ale její vývoj zpomalit a výrazně zlepšit kvalitu života nemocného. Důležitými látkami při ovlivňování AD jsou inhibitory acetylcholinesterázy. V současné době se používají látky z mnoha chemických skupin. V oblasti přírodních látek se provádí výzkum a

hledají se přírodní zdroje, které by mohly být přínosem pro léčbu AD. Jednou z rostlin, o které je známo, že její obsahové látky ovlivňují acetylcholinesterázu je vlaštovičník větší - *Chelidonium majus*.

2. CÍL

Cílem diplomové práce bylo spolu s dalšími diplomantkami Janou Nagyovou, Evou Vítkovou a Dagmar Kubincovou:

1. provést extrakci 41,8 kg suché nati s kořeny vlaštovičníku většího (*Chelidonium majus*), zhruba tento primární extrakt vyčistit (oddestilování rozpouštědla, filtrace) a připravit sekvenčním postupem výtřepky s jednotlivými typy alkaloidů: dva etherové výtřepky (po alkalizaci primárního extraktu uhličitanem sodným a hydroxidem sodným), chloroformový (po okyselení kyselinou chlorovodíkovou a přidání jodidu draselného) a směsí chloroform+ethanol 8,5:1,5 (po alkalizaci extraktu amoniakem),
2. zpracovat část etherového výtřepku připraveného vytřepáním primárního extraktu roztokem uhličitanu sodného s cílem izolovat jeden alkaloid v čisté formě a stanovit jeho základní fyzikálně-chemické charakteristiky,
3. podílet se na stanovení aktivity vůči acetylcholinesteráze (z homogenátu mozku) *in vitro*.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. ALZHEIMEROVA NEMOC

AD tvoří 50-60 % všech demencí. Předpokládá se, že tímto onemocněním trpí každý desátý člověk starší 65 let a až každý druhý ve věkové skupině nad 85 let.

Podle doby objevení prvních příznaků se AD dělí na presenilní a senilní formu. Presenilní forma je forma s časným začátkem, příznaky se objeví před 65. rokem života. Senilní forma je forma s pozdním začátkem, příznaky se objeví v 65. roce a později.

3.1.1. *Klinický obraz AD*

Pro AD je typický plíživý, pomalý začátek. Rozlišení prvních poruch paměti od příznaků, které mohou doprovázet normální stárnutí, nemusí být zpočátku jednoduché.

Mezi první příznaky, které zprvu zaznamenává pacient či jeho okolí, bývá zapomínání běžných každodenních událostí. Pacient si nedokáže vybavit, co měl k obědu, koho potkal, co měl nakoupit. Výrazně bývá postižena krátkodobá paměť, pacient má problém si zapamatovat nová jména, události. Obvykle v časných stádiích se objevují poruchy vizuospaciálních funkcí (prostorová orientace, orientace zrakem v prostoru), pacienti nejsou schopni se orientovat v místech, která znají málo, později mají problém i na místech známých. Dostavují se poruchy soudnosti a logického uvažování, řídne slovní zásoba. Postupně se projevují poruchy výkonostních funkcí, nemocný není schopen naplánovat a provést komplexní úkol (např. zapomené postup při vaření). V průběhu choroby dochází k postupnému zhoršování intelektových schopností a k zániku náhledu choroby (pacient si nemoc přestane uvědomovat). Velmi často se u nemocných dostavuje afazie (porucha řeči), apraxie (pacienti nejsou schopni vykonávat naučené dovednosti), či agrafie (porucha písma) a alexie (porucha čtení). V pozdějších stádiích bývají těžší poruchy chování, běžné jsou stavy neklidu, projevy agresivity, pacienti odcházejí z domova (díky poruchám orientace se pak ztrácejí), může se vyskytnout neúčelná kutivost. Významné jsou emoční poruchy s oploštěním vyšších citů, objevuje se egocentrismus, poměrně častý je výskyt depresivních stavů, mohou se vyskytnout bludy často bizarního obsahu (někdo jim krade šaty ze skříně) a halucinace. V pokročilejších stádiích nejsou nemocní schopni samostatně vykonávat každodenní aktivity, nejsou schopni se bez pomoci obléknout, najíst, udržovat hygienu. Pacienti

se dostávají do stavu úplné závislosti, jsou odkázáni na péči svého okolí. V terminálních stádiích AD bývají nemocní upoutáni na lůžko, dostavuje se inkontinence moči i stolice, mají obtíže s příjmem potravy, dochází k rozvoji dekubitů. AD trvá zpravidla několik let, jen výjimečně více než 10 let od objevení se prvních klinických příznaků. Presenilní formy, především s familiárním výskytem, mívají zpravidla rychlejší průběh. Pacienti umírají na interkurentní choroby, selhání životních funkcí, někdy i na následky úrazů.

3.1.2. Diagnostika AD

Diagnóza AD vychází z diagnózy syndromu demence. Základním krokem je tedy zjištění přítomnosti demence. Pro zjištění demence jsou důležité anamnestické údaje, dále klinické vyšetření, včetně zobrazovacích či testových metod.² Paměťový test učení spočívá v zapamatování si určitého počtu slov. Tato slova jsou pak pacientovi přečtena, následně je vyzván, aby se jich pokusil zopakovat v libovolném pořadí co nejvíce. Obdobnou zkoušku představuje test verbální fluence, kdy je pacient vyzván, aby se pokusil vybavit si co nejvíce slov začínajících stejným písmenem. Dále existuje řada dalších testů zaměřených na orientaci v čase a prostoru, testy početní, grafické a mnoho jiných zkoušek, z kterých lze odvodit celkový stav paměti, případně průběhu nemoci.³ Z pomocných vyšetření je možno využít zobrazovací metody: počítačové tomografie (CT) a nukleární magnetická rezonance (NMR) mozku.

3.1.3. Neurobiologické změny

V průběhu normálního stárnutí klesá hmotnost i objem mozku, pokles se projevuje zejména po 55. roce života. S věkem se rovněž snižuje tloušťka mozkové kůry, po 60. roce věku se navíc i rozšiřují mozkové komory. V průběhu AD probíhají podobně změny jako při normálním stárnutí. Změny jsou podstatně nápadnější u presenilní formy AD. Numerická atrofie neuronů v průběhu AD převyšuje numerickou atrofii u normálního stárnutí o 40-80 %. Nejpostiženější je spánkový lalok. Není přesně známo, proč neurony při AD zanikají, možným důvodem apoptózy (programovaný zánik buňky) neuronů je ukládání β -amyloidu, dalším možným důvodem je oxidativní stres.

Senilní plaky

Důležitou roli při AD hraje extracelulární ukládání degenerativního proteinu β -amyloidu.

Tento protein vzniká z bílkoviny tělu vlastní, z amyloidového prekurzorového proteinu (APP), který je obsažen v neuronech. Za normálních podmínek je APP štěpen na krátké rozpustné částice α - a β - sekretázou. Za patologických podmínek se uplatňuje γ -sekretáza, štěpící delší fragmenty, které mají tendenci ke koagulaci a tak dochází k tvorbě β -amyloidu. Shluky β -amyloidu tvoří základ senilních tzv. Alzheimerovských plaků. V placích dochází okolo drúz amyloidu k odumírání neuronů. Jsou aktivovány gliové buňky, které začnou produkovat cytokiny, reaktivní formy kyslíku (ROS) a další látky akutní zánětlivé fáze. Dochází k aktivaci enzymu cyklooxygenázy II a tím ke zvýšené tvorbě prostaglandinů. Uvolněné zánětlivé reaktanty vedou k dalšímu poškození neuronů. ROS způsobují peroxidaci lipidů neuronální membrány a rovněž tak poškozují neurony. Při neuronálním poškození dochází k uvolnění excitačních aminokyselin (glutamátu, aspartátu) a po jejich vazbě na příslušné receptory k nadměrnému vstupu kalcia do neuronů. Metabolické intraneuronální změny, které následují, vedou k apoptóze.

Senilní plaky se dají zobrazit řadou metod, v současnosti se různými druhy barvení dá rozlišit celkem osm typů senilních plaků a patogeneticky blízkých struktur. Počet senilních plaků vztažený na plošnou jednotku mozkové kůry je jedním z kritérií definitivní, tj. histologické diagnózy AD.

Tau-protein, neuronální klubka

Neuronální klubka, tangles, jsou synonymem pojmu Alzheimerovy změny neurofibril. V mikroskopu se jeví jako párová spirální vlákna a jejich podstatnou součástí je tau-protein. Tento protein, spjatý s neuronálními mikrotubuly, degeneruje odštěpením krajních aminokyselin, látka pak vytváří filamenta, která jsou základem neuronálních klubek.

Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (ApoE) je protein, který se podílí na redistribuci lipidů mezi buňkami jednotlivých orgánů i mezi buňkami téhož orgánu. Gen pro ApoE se vyskytuje ve třech podobách, které kódují vznik tří různých izoform ApoE2, ApoE3

a ApoE4. Nejčastější z nich je ApoE3 (asi 78 % populace), ApoE4 se objevuje asi u 17% lidí, u zbylé části populace se nalézají ApoE2. Nosičství alely ApoE4 je významným rizikovým faktorem vzniku AD.

Oxidační stres

V patogenezi se může uplatňovat oxidační stres a ROS. To jsou atomy nebo molekuly, které jsou vedlejším produktem oxidačních reakcí a jsou nositeli nepárového elektronu. Některé ROS jsou vysoce reaktivní a mohou poškodit DNA, buněčné proteiny a lipidy membrán.

Změny neurotransmiterových systémů

Z neurotransmiterových systémů je nejvíce postižen systém acetylcholinergní. Typicky je postižena presynaptická oblast, je snížena aktivita enzymu syntetizujícího acetylcholin (cholinacetyltransferáza), je snížen vstup prekursorů (cholin, acetylkoenzym A) a zpětné vychytávání acetylcholinu i jeho uvolnění z presynaptického zakončení. Z dalších systémů je postižen serotoninergní, je snížena hladina somatostatinu. S věkem klesá i syntéza dopaminu a stoupá jeho inaktivace monoaminoxidázami (MAO). Zvláště stoupá aktivita MAO typu B jak s věkem, tak výrazněji u AD.

3.1.4. Příčiny AD

Příčiny AD zůstávají dosud neobjasněny. Předpokládá se vliv řady faktorů, které mohou onemocnění navodit nebo k němu přispívat ve vzájemné součinnosti:

- Genetické faktory
- Zánětlivé faktory, porucha imunitního systému
- Neúplná nebo nekonvenční virová infekce
- Environmentální faktory, např. neurotoxický vliv některých chemických látek

3.1.5. Rizikové faktory AD

- Věk – výskyt AD před 60. rokem je vzácný. S přibývajícím věkem strmě stoupá. Není však zřejmé, jestli rizikovým faktorem je sám věk, nebo fakt, že se ve vyšším věku může přidávat působení dalších vlivů. Někdy se říká, že AD je vlastně nepřírozeně urychlené stárnutí mozku.

- Ženské pohlaví – ženy jsou AD postiženy častěji než muži. U mužů je naopak častější demence cévního typu.
- Nízká úroveň vzdělání a nízká duševní aktivita. Učení vyžaduje zvýšení aktivity mozku. Tím se náš mozek vyvíjí a je odolnější. Učení povzbuzuje vytváření nových spojů v našem mozku. Činnost otupující naše myšlení a vnímání zaměstnává jen malé části našeho mozku. Při jejím dlouhodobém provádění se může stát, že se nepoužívané oblasti začnou zmenšovat.
- Apolipoprotein E – ApoE4 zvyšuje riziko AD.³
- Rodinná anamnéza – dědičnost AD je stále předmětem výzkumu. Přími pokrevní příbuzní jsou postiženi 4 krát častěji než všeobecná populace. Z řady dosud provedených genetických studií vyplývá, že o dědičnosti rozhoduje více než jeden genetický faktor. AD je spojena s abnormalitami na chromozomech 21, 19, 14, 1 a pravděpodobně i 12.²
- Úrazy hlavy – těžší nebo opakované úrazy hlavy mohou zvýšit pravděpodobnost rozvoje demence. Známý je častější výskyt demence u sportovců, kteří utrpěli vícekrát úraz hlavy s bezvědomím – hlavně boxeři.
- Vysoký krevní tlak, vysoké hladiny lipidů a cukrovka – v posledních letech se zjišťuje, že tyto nemoci, zvláště pokud nejsou řádně léčeny, jsou rizikovými faktory nejen pro srdeční infarkt a mozkovou mrtvici, ale i pro rozvoj demence cévního typu a AD.
- Kouření a nezdravý životní styl.³

3.2. TERAPIE AD

V současnosti není zcela známa etiopatogeneze AD a není tedy možná kauzální léčba.

Terapie AD je komplexní, zahrnuje farmakoterapii, psychoterapii a socioterapii, léčbu interkurentních onemocnění, rehabilitaci a spolupráci s rodinou a pečovateli nemocného.

Farmakoterapii AD lze zhruba rozdělit do dvou základních skupin:

- 1) Farmakoterapie kognitivních funkcí (intelekt, paměť, motivace)
- 2) Farmakoterapie nekognitivních funkcí (ovlivnění ostatních, druhotně postižených psychických funkcí, jako např. emotivity, spánku, delirií)

3.2.1. Kognitivní farmakoterapie AD

3.2.1.1. Substituce nedostatkovými neurotransmitery nebo neuromodulátory

U AD je nejvíce postižen acetylcholinergní systém, zejména oblast presynaptická, zatímco oblast postsynaptická zůstává poměrně intaktní. Látky, které se používají pro zlepšení funkce centrálního acetylcholinergního systému se obvykle označují jako kognitiva.

a) Substituce prekursorů acetylcholinu

Substituce samotným acetylcholinem není možná pro jeho příliš krátký poločas, cholin se nepoužívá, protože může působit depresogenně. Používají se proto různé formy lecitinu, především sojový lecitin. Z lecitinu se postupně uvolňuje cholin pro syntézu acetylcholinu. Lepších výsledků je dosaženo kombinovanou terapií lecitinu s inhibitory acetylcholinesteráz než v monoterapii lecitinem.²

b) Použití inhibitorů acetylcholinesterázy

Acetylcholinesteráza (AChE) je enzym, který odbourává acetylcholin v CNS. Na periférii převládá butyrylcholinesteráza (BuChE). Zablokováním tohoto odbourávajícího enzymu zvýšíme množství acetylcholinu schopného vazby na své receptory.⁴ Důležité je, aby tyto látky specificky blokovaly mozkovou AChE bez ovlivnění její periferní formy (to by mohlo vést k řadě nežádoucích účinků jako např. svalové křeče, nauzea, pocity slabosti, průjmy, pocení a tachyarytmie).²

Obě formy cholinesteráz jsou rozlišeny geneticky, strukturně a také reakční kinetikou. Butyrylcholin není fyziologickým substrátem v savčím mozku a role BuChE je dosud obtížně interpretovatelná. V lidském mozku se BuChE nachází v neuronech, gliových buňkách, stejně tak jako v neuritovém plaku a tangles u pacientů s AD. Zatímco acetylcholinová aktivita snižuje progresivitu AD v mozku nemocných pacientů, BuChE aktivita může zvýšit progresivitu, záleží však na dalších faktorech. Na základě různých modelů (a u pacientů s pokročilou AD) se však zdá, že BuChE může určitou měrou nahradit AChE při hydrolýze mozkového acetylcholinu.⁵ BuChE se ukázala skutečně novým cílem v terapii AD. AChE je predominantní ve zdravém mozku, BuChE hraje patrně určitou minoritní roli v regulaci hladiny mozkového acetylcholinu. V případě mozku s AD se aktivita

BuChE progresivně zvyšuje, zatímco aktivita AChE zůstává nezměněna, resp. se snižuje.⁶

Inhibitory acetylcholinesterázy různé struktury jsou významnými látkami pro ovlivňování demence Alzheimerova typu. Nové inhibitory AChE mohou přinést poznání ke struktuře těchto léčiv nového typu a usnadnit tak poznání interakce mezi inhibitory a enzymem. V současnosti je spektrum klinicky použitelných látek relativně úzké.^{7,8}

- Karbamáty - rivastigmin
- Piperidinové deriváty - donepezil
- Akridinové deriváty - takrin
- Alkaloidy - galanthamin
- Deriváty organofosfátů – metrifonát

c) Použití agonistů muskarinových i nikotinových acetylcholinergních receptorů

Bylo zjištěno, že příznivý efekt mají agonisté muskarinových M1 a M3 receptorů. Látky, které působí agonisticky na M2 receptorech, kognitivní buňky poškozuje. Intenzivně je zkoušen xanomelin a milamelin.

d) Ovlivnění acetylcholinergního systému prostřednictvím jiných neurotransmiterových systémů

Acetylcholinergní systém je pod vlivem tonické inhibice GABAergního systému. Hledají se proto látky, které by parciálně inhibovaly GABA-A receptory tak, aby se odblokovala pouze tato tonická inhibice. Zkoušejí se látky ze skupiny β -karbolinů např. gedokarnil.

e) Další látky ovlivňující acetylcholinergní systém

- Indeloxazin – stimuluje uvolnění acetylcholinu z presynaptického zakončení.
- Nicergolin – nootropikum, působí jako vasodilatans.
- Acetyl-L-karnitin – zlepšuje příjem prekurzorů pro syntézu acetylcholinu do neuronů.

3.2.1.2. Ovlivnění neuronálního metabolismu

U pacientů s AD bývá popisován snížený neuronální metabolismus, zejména oxidativní metabolismus glukózy a buněčná proteosyntéza.

Proto se u pacientů s touto diagnózou užívají nootropní látky, v širším slova smyslu zvyšovače mozkového metabolismu (cerebral metabolic enhancers). Nootropika zvyšují utilizaci glukózy, zvyšují oxidativní metabolismus, některá z nich mohou zlepšovat plasticitu erytrocytů, působit jako lapače ROS. Často jsou součástí kombinované terapie demencí. Mezi ně patří:

- Piracetam
- Pyritinol
- Nicergolin
- Meklofenoxát
- Extractum ginkgo bilobae
- Dihydroergotoxin

3.2.1.3. Scavengery ROS

V patogenezi AD hraje roli působení ROS, což jsou velmi reaktivní formy molekul různých látek, mezi nejreaktivnější ROS patří singletový kyslík, hydroxylový ion, superoxid, oxid dusnatý. V organismu zastávají fyziologické funkce, především úlohu informativní, jejich množství však musí být regulováno. Odstraňovány jsou pomocí enzymů superoxiddismutázy, katalázy a glutathionperoxidázy. Za patologických podmínek vzniká více ROS než jsou schopny příslušné enzymy zpracovat a radikály poškozují řadu jiných enzymů, způsobují peroxidaci lipidů neuronální membrány a pravděpodobně se podílejí na spuštění aterogeneze. K likvidaci nadměrného množství ROS se používají tzv. scavengery (lapači, zametači) ROS, jedná se o látky tělu vlastní, ale i o látky dodávané potravou či léky:

- α -Tokoferol
- Kyselina askorbová
- Retinol
- Melatonin
- Pyritinol
- Extractum ginkgo bilobae
- Lazaroidy
- Selegilin

- Selen
- Silymarin
- Lykopen

3.2.1.4. Ovlivnění excitotoxicity

Aspartát a glutamát, excitační aminokyseliny působící v mozku jako neuromediátory, jsou nutné v procesu učení a paměti. Nadměrné působení těchto aminokyselin především na NMDA-receptory vede ke zvýšenému vstupu kalcia do neuronů, které vede k destabilizaci vnitřního prostředí a následnému zániku neuronu. Hledají se proto látky, které blokují NMDA-receptory. Pravděpodobně takto působí některé látky obsažené v extraktu z *Ginkgo biloba*, selegilin, memantin a cykloserin.

3.2.1.5. Nervové růstové faktory

Nervové růstové faktory, které jsou produkovány nervovým systémem, jsou důležité pro plasticitu neuronů, stimulují jejich růst (u plodu). Používá se preparát Cerebrolysin, což je peptidový preparát z mozků prasat. Podporuje funkci nervových buněk, ovlivňuje neuronální plasticitu, zvyšuje penetraci glukózy do mozkové tkáně, ovlivňuje porušený oxidativní metabolismus v mozku.

Předpokládá se, že stimulace některých nikotinových receptorů vede k uvolnění nervových růstových faktorů, podobně jako stimulace trk-receptorů (receptory spojené s aktivací tyroxinkinázy). Jako stimulator uvolnění nervových růstových faktorů působí i selegilin.

3.2.1.6. Protizánětlivé látky, estrogeny, statiny

U AD dochází k projevům zánětlivé reakce, která přispívá k zániku neuronů. Podávání protizánětlivých látek, které procházejí hematoencefalickou bariérou, pravděpodobně působí jako preventivní faktor.

Řada údajů dokládá důležitou úlohu estrogenů v procesu stárnutí, estrogeny byly považovány za protektivní faktor ke snížení rizika AD u žen, ale pozdější studie tuto protektivní roli neprokázaly.

Statiny snižují krevní hladinu cholesterolu a jiných lipidů. Poslední studie prokázaly příznivý vliv u všech forem demence. Statiny pravděpodobně mohou významně redukovat riziko rozvoje AD.

3.2.2. Nekognitivní farmakoterapie AD

Tato terapie zahrnuje léčbu přidružených, nekognitivních symptomů AD.

Nejčastěji se jedná o léčbu poruch spánku. Klasická hypnotika používáme co nejméně, protože obvykle nepříznivě ovlivňují kognitivní funkce. Dává se přednost nebenzodiazepinovým hypnotikům, jako je např. zolpidem či zopiklon. U pacientů s neklidem a delirantními stavy je možné použít jako hypnotika látky ze skupiny neuroleptik, dobře tolerován je tiaprid, melperon a risperidon.

Depresivní a úzkostné stavy u pacientů s demencí léčíme nejčastěji pomocí selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (fluoxetin, fluvoxamin, citalopram), rovněž je možno podávat inhibitory monoaminoxidáz (moklobenid, selegilin). Klasická antidepresiva I. generace nepoužíváme pro jejich anticholinergní nežádoucí účinky.

U AD se často vyskytují stavy psychomotorického neklidu, pacienti mohou být agresivní, mohou se u nich vyskytovat halucinace a bludy. Ke zvládnutí těchto situací lze použít stejná neuroleptika jako u poruch spánku, ale s vyšším dávkováním.²

3.3. INHIBITORY AChE – PŘÍRODNÍ LÁTKY

V tradiční medicínské praxi se používá mnoho rostlin k léčbě kognitivních poruch, zahrnující neurodegenerativní onemocnění jako AD a další jiné poruchy paměti. V současnosti se provádí farmakologický výzkum mnoha přírodních zdrojů, které mají vést k identifikaci potencionálních nových léčiv, zahrnujících právě ty k léčbě poruch paměti. Je mnoho léků přístupných v západní medicíně, které byly izolovány z rostlin. Například některé alkaloidy z přírodních zdrojů byly zkoumány pro jejich vlastnosti při AD a nyní jsou v klinickém užití (galanthamin). Různé další čeledi se ukázaly přínosné při AD nebo farmakologické aktivity naznačují potenciál pro jejich užití v léčbě AD.⁹

Velmi významnou roli hraje studium přírodních látek, protože struktura těchto poměrně složitých molekul významně modifikuje účinek nejen ve smyslu vlastního efektu, ale především vedlejších účinků. Inhibice AChE byla pozorována např. u:

- obsahových látek z Tea Tree Oil (1, 8 – cineol, terpinen – 4 – ol)¹⁰
- α -onocerinu, *Lycopodium clavatum*, Lycopodiaceae¹¹
- galanthaminu, *Galanthus worovii*, Amaryllidaceae¹²
- huperzinu, *Huperzia serrata*, Lycopodiaceae^{13, 14, 15, 16}

- salignenamidu C, *Sarcococca saligna*, Buxaceae¹⁷
- ursolové kyseliny, *Majorana hortensis*, Lamiaceae¹⁸
- kurcuminoidů *Curcuma longa*, Zingiberaceae¹⁹
- α -viniferinu, *Caragana chamlague*, Fabaceae²⁰
- protopinu, Papaveraceae²¹
- dehydroevodiaminu, *Evodia rutaecarpa*, Rutaceae
- (+)-homomoenjadaraminu, moenjadaraminu, *Buxus hyrcana*, Buxaceae
- cykloprotobuxinu C, cyklovirobuxeinu A, cyklomikrofilinu A, *Buxus papillosa*, Buxaceae
- cynatrosidu A, B, C, *Cynanchum atratum*, Ranunculaceae²²

U některých přírodních látek byla pozorována spřažená aktivita: inhibují jak AChE, tak BuChE.^{17,23} Při syntéze nových léčiv tohoto typu je velmi zásadní stereochemie: terapeuticky významně aktivní jsou pouze některé stereoizomery²⁴ (a tento stav se uplatňuje i z hlediska ovlivnění AChE a BuChE, jak je to vidět např. u stereoizomerů huperzinu A²³). Tento faktor musí být významně zohledněn, protože jinak dochází v řadě případů k výraznému vzestupu nežádoucích účinků.

Jedna z rostlin, u kterých se vyskytly alkaloidy biologicky aktivní vůči AChE, je vlaštovičník větší, *Chelidonium majus*. Jeho výzkum se v poslední době poměrně rozšiřuje z důvodu antineoplastického účinku alkaloidního přípravku nazývaného Ukrain (preparát obsahuje extrakt alkaloidů z *Chelidonium majus* konjugovaných s kyselinou thiofosforečnou)²⁵, efektu benzofenantridinových alkaloidů na lidské keratinocyty²⁶ a díky inhibici 5- a 12- lipoxygenázy neredoxním mechanismem²⁷ a dalších účinků.

3.4. BOTANICKÝ POPIS

3.4.1. Vlastní popis

Vlaštovičník větší (*Chelidonium majus*) je 30 – 50 (70) cm vysoká rostlina, roztroušeně chlupatá, s tlustou a krátkou kořenovou hlavou s četnými kořeny. V celé rostlině jsou článkované mléčnice s oranžovou šťávou. Lodyha je přímá, oblá, dutá a rozvětvená. Listy jsou střídavé, bez palistů, dolní řapíkaté a horní přisedlé, s chobotnatě peřenodílnou až lichozpeřenou, svrchně temně, vespod sivozelenou čepelí; s křídlatým větvením. Úkrojky (lístky) jsou nesouměrné, chobotnatě vroubkované až zastříhávané. Květenstvím je chudokvětý okolík. Květy jsou obojaké,

dvoučetné, dlouze stopkaté, s volnými obaly. Kališní lístky jsou dva, světle žluté, záhy opadavé a korunní 2+2, široce vejčité, vzadu dřípáté, sytě žluté. Tyčinky jsou četné a žluté. Semeník je svrchní, ze dvou plodolistů, jednopouzdrý, čárkovitý a se dvěmi nástěnnými semeníci. Plodem je lysá, šešuli podobná tobolka, pukající od stopky dvěma chlopněmi. Semena jsou vejcovitá, černá, se sítnatě dolíčkátým osemením a bílým masitým výrůstkem.²⁸

3.4.2. Systematika

Chelidonium majus L je rostlinný druh z čeledi mákovitých (Papaveraceae).

V rodu *Chelidonium majus* L. existují různé morfologické variety:

-var. *crenatum*

-var. *fumariifolium*

-var. *maius*

-var. *tenuifolium*

Existují různé karyotypy: $2n = 12$, jedná se o rostliny mnoha stanovišť v Evropě a Asii; $2n = 10$, rostoucí v Japonsku a východní Evropě; $2n = 20$, rostoucí v Japonsku; v Polsku existuje tetraploidní vyšlechtěná odrůda $2n = 24$. Je zde pěstována a označována jako *Chelidonium majus* „Cynober“.²⁹

3.5. OBSAHOVÉ LÁTKY

Hlavními obsahovými látkami vlaštovičníku jsou alkaloidy. V rostlině jich bylo popsáno již více než třicet. Za zmínku stojí, že z tohoto počtu jich 15 poprvé izoloval a převážně určil prof. Slavík. S výjimkou sparteinu patří popsané alkaloidy k derivátům izochinolinu. Řadí se k 8 strukturním typům, jejichž přehled uvádí tab.1.

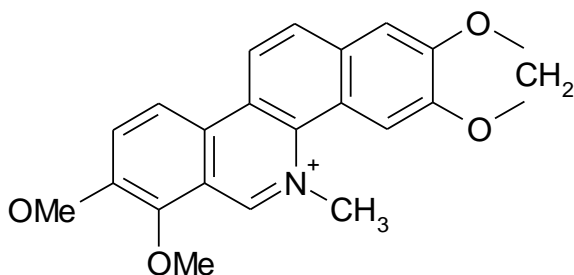
Tabulka 1: Přehled alkaloidů z *Chelidonium majus*

Alkaloid		Kořen	Nadzemní část
Kvartérní benzo[c]fenanthridiny	Sanguinarin	+++	+++
	Chelerythrin	+++	+++
	Chelirubin	+	+
	Chelilutin	+	+
	Makarpin	+	+
Terciární benzo[c]fenanthridiny	Chelidonin	++	+++
	Homochelidonin	+++	+
	Chelamin	+	-
	Chelamidin	+	-
	Dihydrosanguinarin	+	+
	Dihydrochelerythrin	+	+
	Dihydrochelirubin	+	-
	Dihydrochelilutin	+	-
	N-Demethyl-9,10,- dihydrooxysanguinarin	+	-
	Chelidimerin	?	?
	Norchelidonin	+	+
	Izochelidonin	-	+
	Oxysanguinarin	+	-
	Methoxychelidonin	-	-
Terciární protoberberiny	Stylopin	++	++ až +++
Kvartérní protoberberiny	Methylstylopinium	+	+
	Berberin	++	+++
	Koptisin	+++	+++
	Korysamin	+	+
Protopiny	Protopin	++	+
	Allokryptopin	++	+
Kvartérní aporfiny	Magnoflorin	+++	-
	Turkiyenin	+	+
	Sparteín	?	?

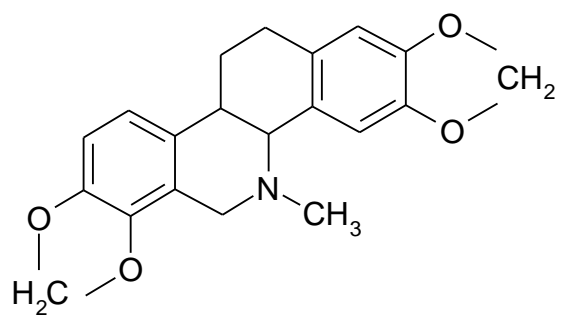
Je známo, že distribuce alkaloidů v rostlině je nerovnoměrná, mění se v průběhu vegetace, v závislosti na klimatických podmínkách a stáří rostliny. Nejbohatším orgánem je kořen, obsah alkaloidů v něm často dosahuje až 2-3 %, kulminuje na konci vegetačního období, zatímco při kvetení rostliny klesá. U víceletých rostlin je obsah alkaloidů v kořeni výrazně vyšší než v prvním roce vegetace.²⁵

Hlavními alkaloidy kořene jsou koptisin a chelidonin, významný je i obsah sanguinarinu, chelerythrinu, berberinu a kvartérního aporfinového alkaloidu magnoflorinu. V nadzemních částech rostliny je zastoupení alkaloidů nižší (0,5-1,5 %) a podléhá v průběhu vegetace významným kvalitativním změnám. Jako hlavní alkaloidy jsou uváděny chelidonin, koptisin, stylopin, sanguinarin a chelerythrin. Hlavním alkaloidem je po celé vegetační období koptisin. Jeho obsah v nadzemních částech činil 0,4-0,8 %. Na počátku vegetačního období byl jako druhý hlavní alkaloid nadzemní části stanoven stylopin, přičemž obsah chelidoninu, sanguinarinu a chelerythrinu byl v této době relativně nízký. Po odkvětu rostliny však obsah tří posledně jmenovaných alkaloidů narůstal a ke konci vegetace již patřily k hlavním, zatímco obsah stylopinu výrazně poklesl.²⁵

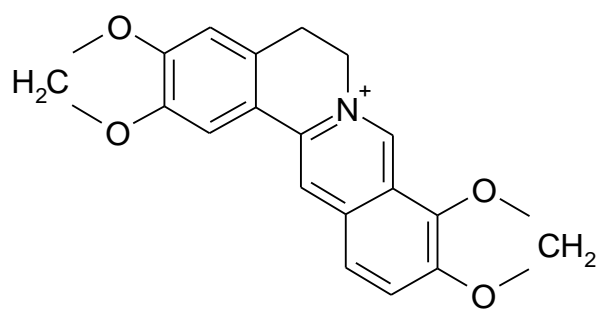
Nealkaloidním sekundárním metabolitům byla dosud ve srovnání s alkaloidy věnována menší pozornost. Dřívější práce uvádějí přítomnost alkoholu chelidonolu, kyselin chelidonové, kávové, ferulové a kumarové, dále vysoký obsah karotenů a kyseliny askorbové, flavonoidů rutinu a kvercetinu. Z minoritních složek byly prokázány blíže nespecifikované triterpenoidy, silice a saponiny, kyselina nikotinová, cholin, methylamin, histamin, tyramin. Z nadzemních částí rostlin byly izolovány estery kyseliny kávové: 2-kafeoylglycerová, 2-kafeoylthreová, 2-kafeoyljablečná a ester kávové kyseliny s 1,4-laktonem kyseliny threonové.²⁵



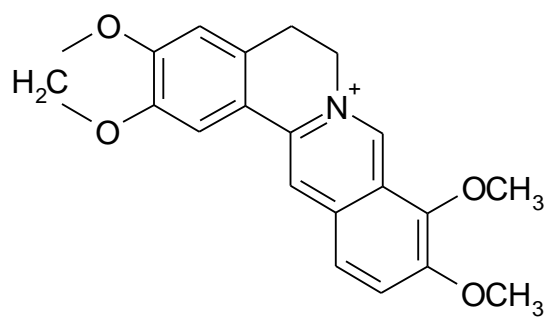
Chelerythrin



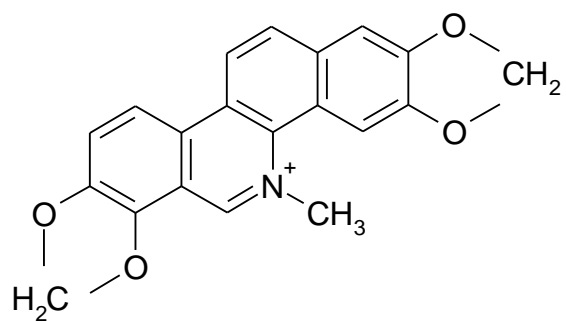
Chelidonin



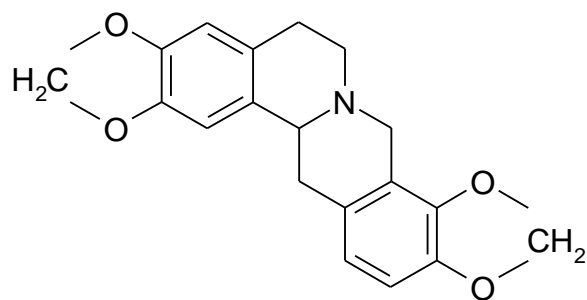
Berberin



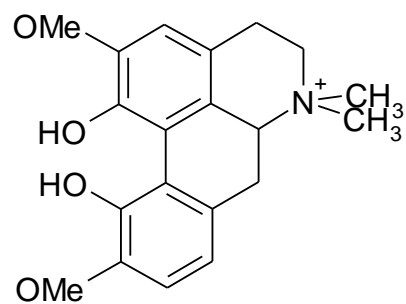
Koptisin



Sanguinarin



Stylopin



Magnoflorin ²⁵

3.6. FARMAKOLOGICKÉ ÚČINKY, VYUŽITÍ ROSTLINY V PRAXI

Využití rostliny má bohatou historii v lidovém léčitelství. Není téměř choroby, proti které vlaštovičník v průběhu staletí nebyl použit. Léčivá moc byla této rostlině přisuzována již za starověku a od té doby byla v léčitelství hojně používána. Byla doporučována proti chorobám jater, zimnici a vodnatelnosti, na zlepšení zraku, k odstraňování bradavic i k léčbě tumorů. V lidové medicíně se traduje použití při kožních potížích jako jsou puchýřkaté vyrážky, svrab a bradavice. Také se doporučuje při zánětech žlučového měchýře, žlučových kamenech, zánětu zažívacího traktu a řadě dalších často velmi závažných onemocnění, nicméně tato doporučení nejsou dosud doložena odbornými studiemi.

V novější době je vlaštovičník užíván ve fytoterapii jako droga s účinkem spasmolytickým, analgetickým, cholagogním, popř. jako dermatologikum, antihistaminikum a antiseptikum.

Extrakty z vlaštovičníku jsou součástí řady galenik, produkovaných zejména v západní Evropě. Jsou indikovány při hepatopatiích, poruchách funkce žlučníku a po jeho operacích. V Číně se extrakty z *Chelidonium majus* užívají při léčbě chronické bronchitidy, dávivého kašle a jako analgetikum. Vlaštovičník je též součástí řady homeopatik.

Uvádí se, že čerstvá rostlina je jedovatá, na kůži a sliznicích vyvolává záněty, otoky až puchýře, vnitřně zvracení, krvavé průjmy a hematurii. Na toxicitě čerstvé šťávy se dle některých údajů podílí blíže nespecifikovaná pryskyřičnatá látka, která se sušením rozkládá a ztrácí účinnost. Toxicita sušené drogy je podstatně nižší, dle některých údajů je již netoxická. V praxi jsou otravy touto rostlinou řídké pro její nepříjemnou chuť a vůni.²⁵

3.6.1. Protinádorové a antivirové působení

Klinické použití vlaštovičníku při léčbě nádorů se datuje již od minulého století. Botkin popsal dva případy karcinomu, léčené extrakty z vlaštovičníku. Další klinické údaje z tohoto období popisují užití chelidoninsulfátu při rakovině žaludku, extraktu z vlaštovičníku při karcinomu prsu a dalších orgánů. Dále má droga dlouhou historii při léčbě bradavic, papilomů a kondylomat. Později při testování rostlinných extraktů na antitumorovou aktivitu byl pozorován inhibiční účinek extraktů z vlaštovičníku na sarkom 180 a Ehrlichův myší karcinom. Při intenzivním výzkumu antitumorové

aktivity v šedesátých letech byly popsány inhibiční účinky extraktů z vlaštovičníku na některé typy nádorů, současně však byla prokázána výrazná cytotoxicita alkaloidů sanguinarinu, chelerythrinu, chelidimerinu, chelidoninu, protopinu a koptisinu. V roce 1968 bylo v experimentech s tkáňovými kulturami zjištěno, že extrakty z rostliny vykazují slabou aktivitu proti viru Herpes simplex. Rovněž v pozdější práci byl potvrzen inhibiční efekt extraktu na virus Herpes simplex a některé adenoviry *in vitro*. Nejsilnější inhibiční účinek však vykazovala frakce neobsahující žádný z typických alkaloidů tohoto druhu. Aktivní složka extraktu nebyla definována.

V nedávné době opět vzrostl zájem o využití vlaštovičníku při terapii karcinomů, a to v souvislosti s přípravkem Ukrain, vyvinutým a patentovaným rakouskými autory. Tento preparát obsahuje extrakt alkaloidů z *Chelidonium majus* konjugovaných s kyselinou thiofosforečnou a vyznačuje se imunomodulační aktivitou. Působí zvýšení počtu T-lymfocytů a normalizaci poměru Th/Ts buněk, bez ovlivnění hladiny imunoglobulinů. Přípravek byl aplikován pacientům s různými typy karcinomů. Byl pacienty dobře snášen, navodil obnovení buněčné imunity, provázené objektivním zlepšením stavu pacientů a v několika případech i regresi tumorů. V *in vivo* studiích na myších tumorech bylo prokázáno, že intravenózní podání Ukrainu snižuje rychlost růstu tumoru. V pokusech *in vivo* bylo doloženo, že preparát obnovuje porušenou schopnost makrofágů lytický štěpit tumorové buňky prostřednictvím stimulace LPS (lipopolysacharid, endotoxin). Obnovená cytolytická aktivita je nezávislá na TNF- α (tumor necrosis factor), což naznačuje, že Ukrain aktivuje alternativní cytolytický mechanismus u makrofágů. Studium dalších vlastností uvedeného přípravku je nadále věnována značná pozornost.²⁵

3.6.2. Hepatotropní a spasmolytické účinky

Droga je stále v současných přehledech fytoterapie doporučována jako spazmolytikum, choleretikum a cholagogum, názory na její účinnost však nejsou jednoznačné. Údaje o pozitivních účincích drogy na sekreci žluče, aktivitu α -amylázy i spazmy hladké svaloviny pochází vesměs ze starších prací. Významné je zvýšení sekrece bilirubinu, cholesterolu a zvýšení aktivity pankreatických enzymů lipázy a α -amylázy po aplikaci 100 mg suchého extraktu z vlaštovičníku. Příznivé účinky preparátu Panchelidon obsahujícího extrakt z čerstvých rostlin s obsahem 20 %

alkaloidů při léčbě chronické cholangitidy, cholelithiázy a diskinezií popsal v roce 1977 Neumann-Mangoldt.²⁵

Preparát vykazoval spasmolytický a středně analgetický účinek, výrazně omezoval diarrhoeu vyvolanou léčbou antibiotiky. Weiss hodnotí účinky vlaštovičníku jako nekonstantní. S odvoláním na vlastní zkušenosti uvádí, že účinnost drogy klesá delším uchováváním a je tedy nutné užívat extrakty vždy z čerstvé drogy. (Dle poznatků Masarykovy University se obsah alkaloidů v usušené droze uchováváním nemění, stejně jako se nemění alkaloidní složení tinktury uchovávané po několik měsíců v chladu). I při podávání čerstvé šťávy z vlaštovičníku však pozoroval, že zatímco v první polovině roku byl efekt jeho působení zřetelný a pacientům přinášel úlevu, po uplynutí této doby začal slábnout, až prakticky v krátké době zcela vymizel. Je pravděpodobné, že uvedené poznatky souvisí s nestandardním složením drogy.²⁵

Větší uplatnění mezi galeniky používanými v současnosti v západoevropských zemích nacházejí směsné extrakty, obsahující vedle vlaštovičníku výtažky dalších drog. Např. preparát Chelidonium-Strath (Strath-Labor) obsahuje směs extraktů z *Herba chelidonii*, *Herba agrimoniae*, *Folium salviae* a *Herba hyperici*, přípravek Hepatofalk Planta (Falk) je směsí extraktů ze *Silybum marianum*, *Chelidonium majus* a *Curcuma xanthorriza*. Preparát obdobného složení Aristochol (Steiner and Co.) byl hodnocen Baumanem, který uvádí, že přípravek zvyšuje choleresi, sekreci lipázy a amylázy. Pozitivní účinky preparátu Hepaticum-Medice (Medice) na metabolismus žlučových kyselin popsal Matzekis.²⁵

3.6.3. Biologické účinky hlavních obsahových látek

Hlavní alkaloidy rostliny jsou koptisin a chelidonin. Přestože koptisin se strukturně jen málo liší od berberinu, jehož biologické účinky byly předmětem řady studií, o účincích samotného koptisinu je známo jen velmi málo. Ze starších prací pochází údaje o jeho cytotoxickém působení. Jsou popsány jeho antimikrobiální a protizánětlivé účinky. Podobně jako berberin inhiboval v dávkách 195 mg/kg/den srážení trombocytů u krys. Má též spasmolytickou a uterotonickou aktivitu. Lze očekávat, že koptisin vykazuje i řadu dalších efektů analogických berberinu.

Druhý hlavní alkaloid chelidonin má významné spasmolytické účinky. Působí na spazmy gastrointestinálního traktu a bronchů, snižuje tonus hladkého svalstva dělohy, uretry a cév. Jeho spasmolytický účinek je poloviční ve srovnání s papaverinem. Chelidonin též snižuje krevní tlak a zpomaluje srdeční aktivitu

působením přes nervus vagus. Polští autoři uvádí, že chelidonin vykazuje inhibiční účinek na dopaminergní struktury u krys v dávkách 50-200 mg/kg. Snižuje spontánní motorickou aktivitu a tělesnou teplotu. Potencuje akci hypnotik, zvyšuje tlumivý účinek reserpinu. Má cholagogní a choleretický účinek a ve žlučových cestách působí antisepticky. Má také antimitotické účinky.²⁵

Značná pozornost byla věnována biologickým účinkům benzofenanthridinových alkaloidů sanguinarinu a chelerythrinu, které byly izolovány i z jiných rostlinných druhů, přičemž kořen vlašovičnicku patří k jejich nejvýznamnějším zdrojům. Již dlouhou dobu jsou známy a v praxi využívány protizánětlivé a antimikrobiální účinky těchto alkaloidů. V zemích bývalého Sovětského svazu je vyráběn preparát Sangviritrin, obsahující směs sanguinarinu a chelerythrinu. Užívá se jako zevní antimikrobiální přípravek. V Severní Americe jsou benzofenanthridinové alkaloidy součástí některých přípravků užívaných v ústní hygieně. Byly popsány inhibiční účinky sanguinarinu a chelerythrinu na celou řadu enzymů, např. na cholinesterázy, alaninaminotransferázu, Na / K – ATPázu, Ca – ATPázu. Oba alkaloidy působí též jako rozpojovače respirace a oxidační fosforylace. S nativní dvouspirálou DNA vytváří komplexy typu interkalace, inhibují syntézu RNA na DNA matrici a enzymovou hydrolýzu DNA. Nedávno byla popsána inhibice proteinkinázy C chelerythrinem. Většina těchto inhibičních účinků je připisována interakci benzofenanthridinů s SH-skupinami enzymů. Oba alkaloidy mohou reagovat v závislosti na pH buď ve formě kvarterního kationu, nebo terciární báze. Sanguinarin rovněž zvyšuje vodivost lipidové dvojvrstvy membrán. Chelerythrin, sanguinarin a chelidonin mají též prokazatelné antimitotické účinky. Zdá se, že mechanismus jejich působení naznačuje nedávné zjištění, že uvedené tři alkaloidy inhibují polymeraci tubulinu. Lze předpokládat, že antimikrobiální i cytostatická aktivita těchto alkaloidů je podmíněna výše uvedenými účinky na řadu klíčových enzymů buněčného metabolismu.²⁵

Řada významných fyziologických účinků byla popsána u kvarterního alkaloidu berberinu, jehož zastoupení v kořeni je srovnatelné se sanguinarinem. Tento alkaloid, jehož hlavním zdrojem jsou druhy rodu *Berberis* sp., má některé účinky podobné chelidoninu. V Evropě a na Dálném východě je po mnoho staletí užíván jako prostředek proti průjmům, žloutence a chronické dysenterii. Stimuluje sekreci žluče a má rovněž hypotenzivní, vasodilatační a sedativní účinky. V *in vitro* pokusech bylo popsáno, že působí jako agonista α -2 adrenoreceptorů lidských krevních

destiček. Působí inhibičně na některé enzymy a má antibakteriální účinky. Řada prací se zabývá účinkem berberinu na srdeční aktivitu. V pokusech na zvířatech byly prokázány jeho pozitivní inotropní a dromotropní a negativní chronotropní efekty.

Rovněž některé z nealkaloidních látek prokázaných v *Chelidonium majus* mají výrazné fyziologické účinky. Kyselina kávová i její estery mají spasmolytickou, cholagogní a antibakteriální aktivitu. Nebylo dosud zkoumáno, do jaké míry se na terapeutických efektech vlaštovičníku mohou podílet tyto látky.²⁵

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

4.1. VŠEOBECNÉ POSTUPY

4.1.1. Destilace a odpařování rozpouštědel

Rozpouštědla byla před použitím destilována; nejprve byl zachycen předek (většinou s vodným azeotropem), poté bylo vydestilováno cca 90 % zbylého objemu rozpouštědla. Rozpouštědla byla uchovávána v hnědých nádobách.

Odpařování chromatografických frakcí bylo prováděno na vakuové odparce při 40°C za sníženého tlaku, případně odpařením určitého množství rozpouštědla proudem dusíku na vodní lázni za normálního tlaku.

4.1.2. Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie byla prováděna systémem stupňovité eluce na neutrálním oxidu hlinitém.

Sloupec byl plněn obvyklým způsobem; nalitím suspenze adsorbentu do rozpouštědla. Vzorek byl nanesen na roztěr s malým množstvím oxidu hlinitého po vysušení v exsikátoru.

4.1.3. Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie byla použita v systému N komor. Komory byly použity nasycené mobilní fází.

V případě použití malých komor (válcových) probíhalo sycení cca 30 minut, u klasických komor probíhalo sycení cca 60 minut.

Chromatografie byla prováděna vzestupně.

4.1.4. Sušení

Odparky byly sušeny za normální teploty a tlaku nebo v exsikátoru za normální teploty a sníženého tlaku.

4.2. POTŘEBY

4.2.1. Rozpouštědla

Benzín, ČSL 4

Cyklohexan, č.

Diethylamin, č.

Ethanol 95%, denaturovaný 5 % methanolu

Ether, č.

Chloroform, č.

Kyselina octová bezvodá, č.

4.2.2. Chemikálie

Acetylcholin jodid, p. a.

Amoniak 25%, č.

Dusík 5.0

Hydroxid sodný, č.

Hydroxid sodný, p. a.

Chlorid sodný, p. a.

Jodid draselný, č.

Kyanid draselný, č.

Kyselina chlorovodíková 36%, p. a.

Kyselina sírová 96%, č.

Síran sodný, č.

Uhličitan sodný bezvodý, č.

4.2.3. Detekční činidla

D 1: Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera³⁰

Roztok A: 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné byl rozpuštěn v 80 ml vody.

Roztok B: 16 g jodidu draselného byl rozpuštěn ve 40 ml vody.

Zásobní roztok: byla připravena směs roztoku A a roztoku B v poměru 1 : 1 (v/v). Tato směs může být uchovávána po dobu několika měsíců v ledničce.

Sprejové činidlo: 5 ml zásobního roztoku bylo přidáno k roztoku 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody.

D 2: Mayerovo činidlo³¹

1,35 g chloridu rtuťnatého a 5,0 g jodidu draselného bylo rozpuštěno ve vodě a doplněno jí do 100 ml.

D 3: UV $\lambda = 254$ nm

Chromatogram byl prohlédnut pod UV lampou při vlnové délce 254 nm.

D 4: UV $\lambda = 366$ nm

Chromatogram byl prohlédnut pod UV lampou při vlnové délce 366 nm.

4.2.4. Vytvářecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S 1: Cyklohexan+diethylamin 9+1

4.2.5. Chromatografické adsorbenty

Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merc)

TLC hliníková fólie, Silikagel 60 F 254, tloušťka vrstvy 0,2 mm.

Oxid hlinitý neutrální, stupně aktivity ~3 (Brockmann-Schodder):

Komerční neutrální oxid hlinitý (Reanal, Hungary) 60-200 μ m byl přesítován přes síto 200 μ m a poté vysušen v sušárně ve vrstvě ne vyšší než 2 cm při teplotě 230°C po dobu 3 hodin. Po zchladnutí (v exsikátoru) byl deaktivován přidavkem 6 % vody (ekvilibrace za protřepávání po dobu 30 minut).

Silufol® UV 254 (Kavalier, Votice)

Hotové desky pro chromatografii na tenké vrstvě.

Podložka: hliníková fólie

Sorbent: Silpearl – širokoporézní silikagel podle Pitry s luminiscenčním indikátorem pro UV 254

Pojidlo: škrob

4.3. BIOCHEMICKÁ ČÁST

Kvartérní inhibitory cholinesteráz izolovány v této práci z *Chelidonium majus* L. byly testovány pro jejich inhibiční schopnost standardním *in vitro* inhibiční testem.³²

4.3.1. Materiál

Homogenát mozku

4.3.2. Přístroje

Automatický titrátor RTS 822, Radiometer, Dánsko

Homogenizátor Ultra-Turrax, Janke–Kunkel, Německo

Průtokoměr plynový, typ PF/PG, trubice č. PG03, VEB Prüfgerate-werk Mendingen, Německo

Ultratermostat typ U3, VEB Prüfgerate-werk Mendingen, Německo

4.3.3. Příprava homogenátů

Z mozků byl odpreparován nucleus caudatus. Preparáty byly opláchnuty fyziologickým roztokem a poté homogenizovány přístrojem Ultra – Turrax jednu minutu při dvaceti tisíci otáčkách za minutu v poměru 1:10 s destilovanou vodou. Poté byl homogenát rozplněn do zkumavek po dvou mililitrech a zmrazen na – 35°C.

4.3.4 Inhibice cholinesteráz

Cholinesterázy jsou kompetitivně inhibovány kvartérními látkami. Pokles aktivity je úměrný použité koncentraci inhibitoru. Stanovení aktivity enzymu je založeno na jeho reakci s nativním substrátem, kdy je tento štěpen na alkohol cholin a kyselinu octovou. Tato je při použití pH-konstantní instrumentace neutralizována kontinuálními přídávky roztoku hydroxidu sodného tak, aby bylo udrženo konstantní pH 8.

0,5 ml homogenátu bylo smíseno s 2,5 ml 3 M roztoku chloridu sodného, 0,2 ml roztoku testované látky a objem byl doplněn destilovanou vodou na 23 ml. Reakční směs byla vytemperována na 25°C, oddělena od okolní atmosféry protékajícím dusíkem, pH bylo nastaveno na hodnotu 8 a spuštěn titrátor. Po té bylo k reakční směsi přidáno 2 ml 0,01 M roztoku substrátu – acetylcholin jodidu. Plotterem titrátoru byla následně zaznamenávána spotřeba 0,01 M roztoku hydroxidu sodného nutná k udržení konstantní pH reakční směsi. Koncentrace testované látky byly zvoleny tak, aby oblast aktivit enzymu byla rovnoměrně pokryta měřícími body od stoprocentní po nulovou aktivitu. Měření byla opakována pro každou koncentraci testované látky nejméně třikrát.

4.3.5. Matematické zpracování experimentálních dat

Hodnoty IC_{50} byly vypočítány z naměřených hodnot nelineární regrese v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.4. IZOLACE

4.4.1. Materiál

Droga (sušená nať s kořeny) byla získána sběrem fy JUGODRVO AD v Chorvatsku v období července-září 2004 a po očištění sušena za normálních podmínek.

Makroskopická, mikroskopická a chemická identifikace byla provedena L. Opletalem.

Metodou podle ČL 2002 bylo stanoveno:

Cizí příměsi (2.8.2.):	12,2 %
Ztráta sušením (2.2.32.):	8,68 %
Celkový popel (2.4.16.):	16,8 %
Stanovení obsahu (alkaloidy jako chelidonin):	1,02 %

4.4.2. Příprava extraktu a jeho čištění

41,8 kg suché nati s kořeny bylo perkolováno 95% ethanolem (celkem získáno 480 l extraktu), extrakt byl zahuštěn na vakuové odparce při 60°C do maximálního odstranění alkoholu, byly přidány asi 2 l vody. Vznikl temně hnědý, dehtovitý, sirupovitý odparek. Při oddestilování lihu ze zahuštěného koncentrátu těkala neurčená látka do vakuové odparky ve formě nahnědlého náletu, nebyla však analyzována.

Tento extrakt byl rotací rozehřát na vodní lázni asi na 40°C, bylo přidáno 8 l 1,5% kyseliny sírové (zahřáté na 40°C) a směs byla tyčinkou dokonale promíchávána po dobu několika minut, potom byl oranžový roztok po zchlazení dokonale slit (dehtovité podíly plavaly jen málo na hladině, seděly více u dna), dehet byl seškrabán, umístěn do velké kádinky, přidáno 500 ml bezvodé kyseliny octové a na vodní lázni byla směs dokonale rozpuštěna na viskózní roztok. K tomuto roztoku bylo přidáváno po částech 7,5 l vody a promícháno; kalný oranžový roztok byl slit, černý pryskyřičnatý podíl rozpuštěn znovu ve 200 ml octové kyseliny, opět zahřán a

srážen 4 l vody. Oba dekantáty byly spojeny, ponechány přes noc stát, poté byl tento oranžový roztok zfiltrován přes skládaný polyamidový filtr (filtr 1), ten byl promyt vodou a ponechán vykapat; vyloučil se práškovitý sediment hnědo-oranžové barvy. Oba kyselé filtráty (z kyseliny sírové i octové) byly spojeny; vyloučila se bělavá sraženina, která na sebe adsorbovala oranžové soli alkaloidů; suspenze byla zfiltrována přes polyamidovou plachetku (filtr 2), filtr promyt vodou. Filtr 1 a filtr 2 byly roztrženy a suspendovány v 1,5 l 1,5% kyselině sírové, suspenze zfiltrována; oranžový filtrát byl přidán ke kyselému roztoku extraktu (celkem 37 l filtrátu).

4.4.2.1 Výtřeppek A z primárního extraktu

Kyselý roztok síranů (37 l) byl neutralizován nejprve pevným práškovým bezvodým uhličitánem sodným na pH cca 9; tekutina se výrazně zakalila a nabyla vzhledu světlého kakaa. Tento roztok byl vytřepán 5 x 15 l etheru, etherové vrstvy byly spojeny, odděleny od zbytku vodné fáze a rozpouštědlo oddestilováno. Hned po prvním vytřepání se roztok vyčeřil (vodná fáze byla oranžová a čistá, čirá), vyloučil se však práškovitý, šedočerný podíl (PP), který byl z etheru oddělen, nakonec vytřepán v baňce 2 x 400 ml etheru, ether přidán k etherovým výtřepkům.

4.4.2.2 Výtřeppek B z primárního extraktu

Sodový extrakt byl zalkalizován 50% hydroxidem sodným na pH 12,0-12,5 a tento roztok vytřepán 5 x 15 l etheru, etherové vrstvy byly spojeny, ostře odděleny od zbytku vodné fáze a rozpouštědlo oddestilováno.

4.4.2.3. Výtřeppek J z primárního extraktu

Vodná bazická (louhová) vrstva byla okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (1:1, tj. asi 17%) na pH 3-3,5. K 16 l tohoto roztoku byl přidán roztok 320 g jodidu draselného ve 480 ml vody, roztok byl promíchán a za občasného třepání ponechán 3 hodiny v klidu. Potom byl extrakt vytřepán 5 x 8,4 l chloroformu.

4.4.2.4. Výtřeppek E z primárního extraktu

Okyselená vodná fáze poskytovala ještě pozitivní reakci na Mayerovo činidlo, byla proto zalkalizována 25% amoniakem na pH 10 (na 1 000 ml cca 80 ml 25% amoniaku) a vytřepána 5 x 8,4 l směsi chloroform+ethanol 8,5:1,5 nasycené vodou. Organická vrstva byla po ostrém oddělení zahuštěna k suchu.

4.4.2.5. Zbýlý vodný extrakt

Tento vodný extrakt obsahoval už jen stopy alkaloidů (srážecí Mayerova reakce), nebyl dále použit.

Tabulka 2: Výsledky separace jednotlivých výtřepků

Typ výtřepku	Hmotnost	Popis
A (ether)	182,0 g	Světlé medové barvy, vysoce viskózní, nekrystalizující
B (ether)	10,06 g	Temně hnědý, velmi viskózní s náznakem krystalů
J (CHCl_3 ; kvart. jodidy kyselý)	14,26 g 4,70 g	Tmavě hnědý, velmi viskózní Žlutý práškovitý sediment
E (CHCl_3 +EtOH 8.5:1.5, kvart. jodidy bazické)	12,45 g	Téměř černý, velmi viskózní

4.4.2.6. Dělení surového výtřepku A

31 g hnědého viskózního odparku bylo rozpuštěno v kádince za stálého míchání tyčinkou v 840 ml 0,3 M kyseliny sírové (komerční 3 M kyselina sírová byla zředěna v poměru 1 ml kyseliny sírové + 9 ml vody); rozpouštění bylo prováděno po částech, šlo snadno, vznikl intenzívně oranžový roztok, na stěnách kádinky zůstaly nerozpuštěné hnědočervené drobký a na povrchu kapaliny zůstala blíže neurčená olejová šmouha. Tento kyselý roztok byl zfiltraval skládaným papírovým filtrem, baňka byla vymyta 20 ml 0,3 M kyseliny sírové a kyselý roztok byl vytřepán 5 x 220 ml etheru. Spojené etherové výtřepky byly promyty 1 x 20 ml 0,15 M kyseliny sírové, potom 1 x 25 ml 4% uhličitanu sodného (oba vytřepávací roztoky byly použity ochlazené na cca 10°C), etherová vrstva byla oddělena a oddestilována (výtřepok L).

Kyselý oranžový roztok byl zneutralizován 10% uhličitanem sodným za vzniku 1,4 l suspenze s šedými vyloučenými alkaloidy (amorfní fáze); tato suspenze byla vytřepána celkem 4 x 750 ml etheru, etherová vrstva oddělena a rozpouštědlo oddestilováno. Vyloučené alkaloidy se prakticky všechny rozpustily v první dávce etheru i s nečistotami (výtřepok A).

Medový krystalizující odparek s alkaloidy byl znovu rozpuštěn ve 300 ml 0,3 M kyseliny sírové, zbylá baňka byla vymyta postupně 200 ml vody (v baňce zbyl oranžový prášek, který se nerozpustil v kyselině sírové, ale pouze ve vodě) a

k tomuto roztoku bylo přidáno 25 g kyanidu draselného (do alkalické reakce); přitom se vyloučily prakticky všechny alkaloidy; vyloučená pevná fáze byla velmi hutná, roztok zšedl a nabyl velmi vysoké viskozity. Tato suspenze byla okyselena 1 M kyselinou sírovou na pH cca 4 (báze se rozpustily, nerozpuštěné zůstaly pouze ps-kyanidy, suspenze opět zřídla), ps-kyanidy byly ponechány klesnout ke dnu, tekutina nad sedimentem byla opatrně odlita, zfiltrována přes Buchnerovu nálevku přes papírový filtr, posléze byla nalita na filtr hutná suspenze pseudokyanidů, promyta vodou a vysušena ve vakuu. Po vysušení byly ps-kyanidy rozetřeny (ps-kyanidy).

1,46 g vzniklých suchých rozetřených ps-kyanidů bylo ve varné baňce přelito 36 ml směsí chloroform+ethanol (objemový poměr 1:2) a směs byla suspendována až k rozpuštění, resp. k stálému jemnému zákalu. Potom bylo přidáno 12 ml 36% kyseliny chlorovodíkové a směs byla vařena na vodní lázni 1 hodinu. Po této době byla zneutralizována 10% uhličitánem sodným na pH cca 7, odpařen chloroform, ethanol a část vody, bylo přidáno 250 ml vody, provedena alkalizace 10% uhličitánem sodným na pH 9 (vyloučila se sraženina) a nafialovělá suspenze byla vytřepána 4 x 150 ml etheru. Organické fáze byly spojeny, ostře oddělena voda, fáze byly vysušeny síranem sodným a rozpouštědlo bylo oddestilováno (kvartérní báze z ps-kyanidů).

1 l slabě kyselého filtrátu po oddělení ps-kyanidů byl zalkalizován 10% uhličitánem sodným na pH 9 a vytřepán 5 x 250 ml etheru. Odparek alkaloidů, žlutavý hrubě krystalický, byl rozpuštěn v 550 ml chloroformu, chloroformový roztok byl vytřepán 3 x 75 ml 5% hydroxidu sodného a 1 x 75 ml vody o teplotě cca 10 °C. V chloroformu zůstaly báze nefenolické, do vodné fáze přešly báze fenolické. Chloroformová fáze byla ostře oddělena od vody, vysušena síranem sodným a rozpouštědlo oddestilováno (AC).

Tento odparek AC byl za mírného zahřátí rozpuštěn ve 130 ml 0,3 M kyseliny sírové a po zchlazení bylo přidáno 130 ml 36% kyseliny chlorovodíkové; asi do 3 minut se vyloučila sraženina nerozpustných chloridů. Po 1,5denním stání v lednici byly chloridy odsáty na fritě, promyty vodou, vysušeny nejprve na vzduchu a potom ve vakuovém exsikátoru. 10,67 g suchých, světle okrových chloridů nerozpustných ve vodě bylo za tepla (60-70°C) rozpuštěno v 1,1 l 0,3 M kyselině sírové, roztok byl ochlazen a nejprve zneutralizován opatrně pevným práškovým uhličitánem sodným do pH cca 7, potom 10% roztokem uhličitanu sodného do pH 9; po zchlazení pod

tekoucí vodou byl vytřepán 4 x 350 ml etheru, etherové vrstvy odpařeny a odparek vysušen (AC₁ z chloridů nR v kyselin chlorovodíkové).

1 l filtrátu po oddělení nerozpustných chloridů alkaloidů byl nejprve zfiltrován přes vrstvu křemeliny (1 cm) pro odstranění zákalu nR chloridů, zalkalizován 10% uhličitánem sodným na pH cca 9 (vyloučila se šedavá vločkovitá sraženina), vytřepán s 4 x 250 ml etheru a rozpouštědlo bylo odpařeno (AC₁ z chloridů rozpustných v kyselině chlorovodíkové).

Louhový roztok a promývací voda s fenoláty alkaloidů byly spojeny, okyseleny 1 M kyselinou sírovou na pH cca 5, roztok byl zalkalizován 10% uhličitánem sodným na pH 9; šedavá suspenze (cca 500 ml) byla vytřepána 4 x 150 ml etheru. Etherové vrstvy byly spojeny, ostře odděleny od vody a po vysušení síranem sodným odpařeny (AC₂).

Tabulka 3: Výsledky separace extraktu A

Označení výtřepku	Hmotnost (g)	Popis
L	0,1561	Tmavě hnědý, olejovitý, s práškovitým výpadkem
Ps-kyanidy	1,46	Světle okrové, nepáchnoucí
Kvart.b. z ps-CN	0,8587	Hnědý, nekystalický
AC	Nevážen	Světle hnědý, medovitý
AC ₁ z chloridů nR	9,4562	Světle okrový, krystalický
AC ₁ z chloridů R	5,0737	Světle nažloutlý, hrubě krystalický
AC ₂	0,1411	Tmavě hnědý, velmi viskózní

nR - nerozpustné

R - rozpustné

4.4.3. Sloupcová chromatografie výtřepku AC₁

Tento odparek obsahuje alkaloidy, jejichž chloridy jsou ve vodě (v roztoku kyseliny chlorovodíkové) rozpustné.

Tabulka 4: Sloupcová chromatografie výtřepku AC₁

Navážka:	5,07 g suché směsi (3 látky)
Adsorbent:	Oxid hlinitý neutrální, stupeň aktivity III, 60-200 µm, 200 g
Vrstva s nanáškou fr.:	2,5 x 5 cm
Dělicí lože:	2,5 x 54 cm; sloupec byl nalit v soustavě benzín+chloroform 9:1
Mrtvý objem:	200 ml
Frakce:	100 ml
Doba toku frakce:	15-20 min.

Tabulka 5: Výsledek primární chromatografie alkaloidních bazí AC₁ na oxidu hlinitém

Frakce	Spojené fr.	Eluční systém	Popis
0		Benzín+ chloroform 9+1	0
1-8	1-10	Benzín+chloroform 8,5+1,5	0
9-10		Benzín+chloroform 8+2	
11	11	Benzín+chloroform 8+2	Žlutý s krystalky
12	12	Benzín+chloroform 8+2	Žlutý s krystalky
13	13-14	Benzín+chloroform 8+2	Téměř bílý, krystal.
14		Benzín+chloroform 8+2	
15	15-17	Benzín+chloroform 8+2	Téměř bílý, krystal.
16		Benzín+chloroform 8+2	
17		Benzín+chloroform 8+2	
18	18	Benzín+chloroform 8+2	Bílý, krystalický
19	19-26	Benzín+chloroform 8+2	Bílý, krystalický
20		Benzín+chloroform 8+2	
21		Benzín+chloroform 8+2	
22		Benzín+chloroform 7+3	
23		Benzín+chloroform 7+3	
24		Benzín+chloroform 7+3	
25		Benzín+chloroform 7+3	
26		Benzín+chloroform 7+3	
27	27	Benzín+chloroform 7+3	Nahnědlý, olejovitý

V dalším postupu jsem zpracovávala frakci 11 a 12, látku pod označením CH-M/A-1.

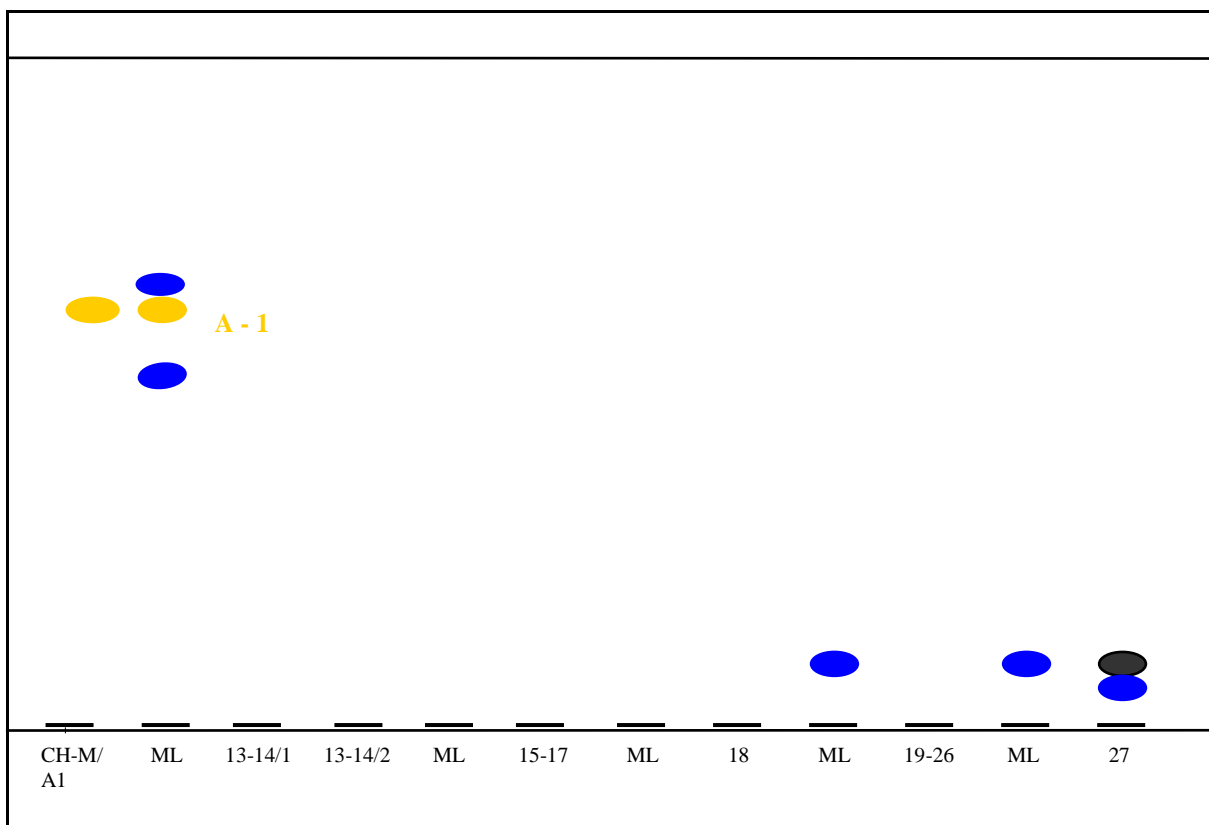
Tabulka 6: Výsledky sloupcové chromatografie na oxidu hlinitém

Frakce	Hmotnost	Popis
Fr. 11: CH-M/A-1	Kr.: 10,4 mg ML: 0,3450 g	Jemně nažloutlé jehličkovité krystaly Oranžová, krystalický, ML po vyloučení krystalů
Fr. 12: CH-M/A-1 „A vyšší“	Kr.: 29,2 mg + 14,8 mg ML: 0	Jemně nažloutlé jehličkovité krystaly ML rozdělen prep. TLC na 2 zóny

4.4.4. TLC jednotlivých frakcí z výtřepku A

Obr. 1: TLC jednotlivých frakcí z výtřepku A

S 1, komora nasycená, vyvíjení 2x , D 4 bez indikátorů

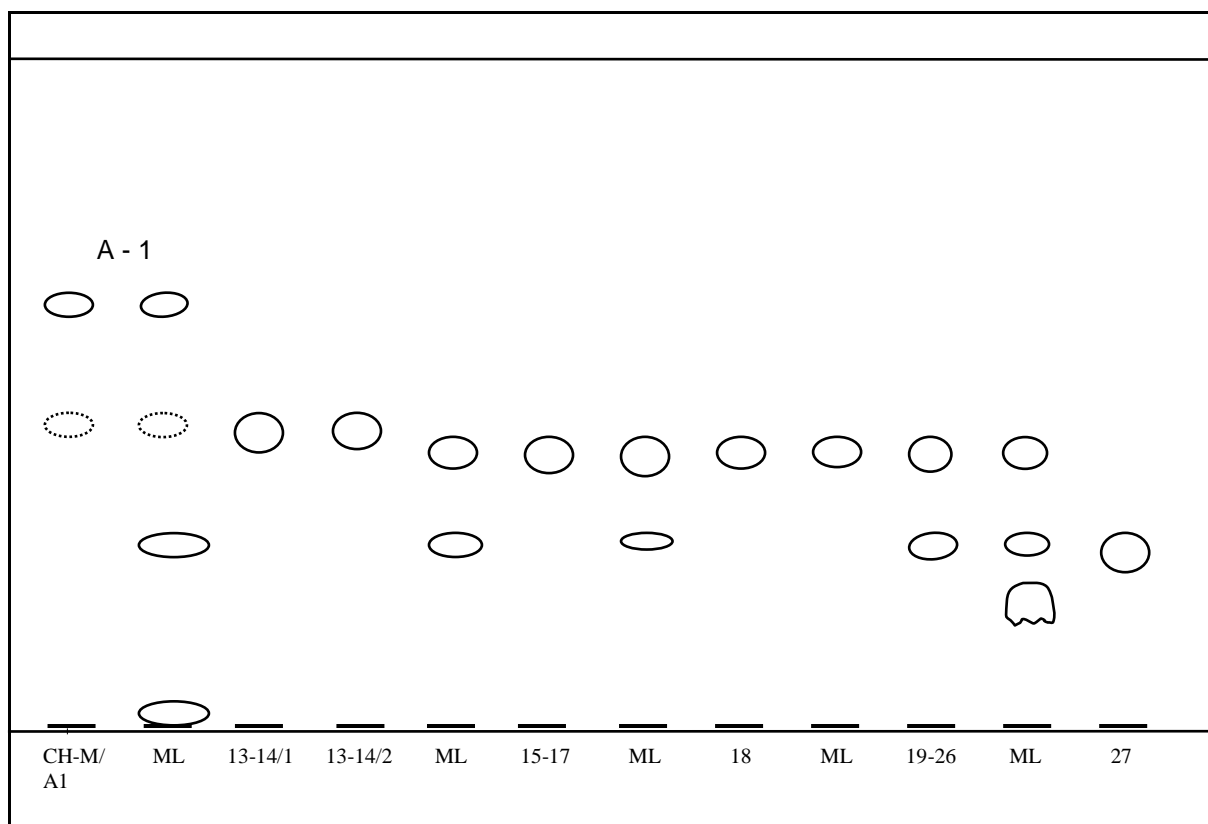


CH-M/A-1: $R_F=0,63$ žlutá

ML: $R_F=0,63$ žlutá (CH-M/A-1)

Obr. 2: TLC jednotlivých frakcí z výtřepku A

S 1, komora nasycená, vyvíjení 2x, D 3

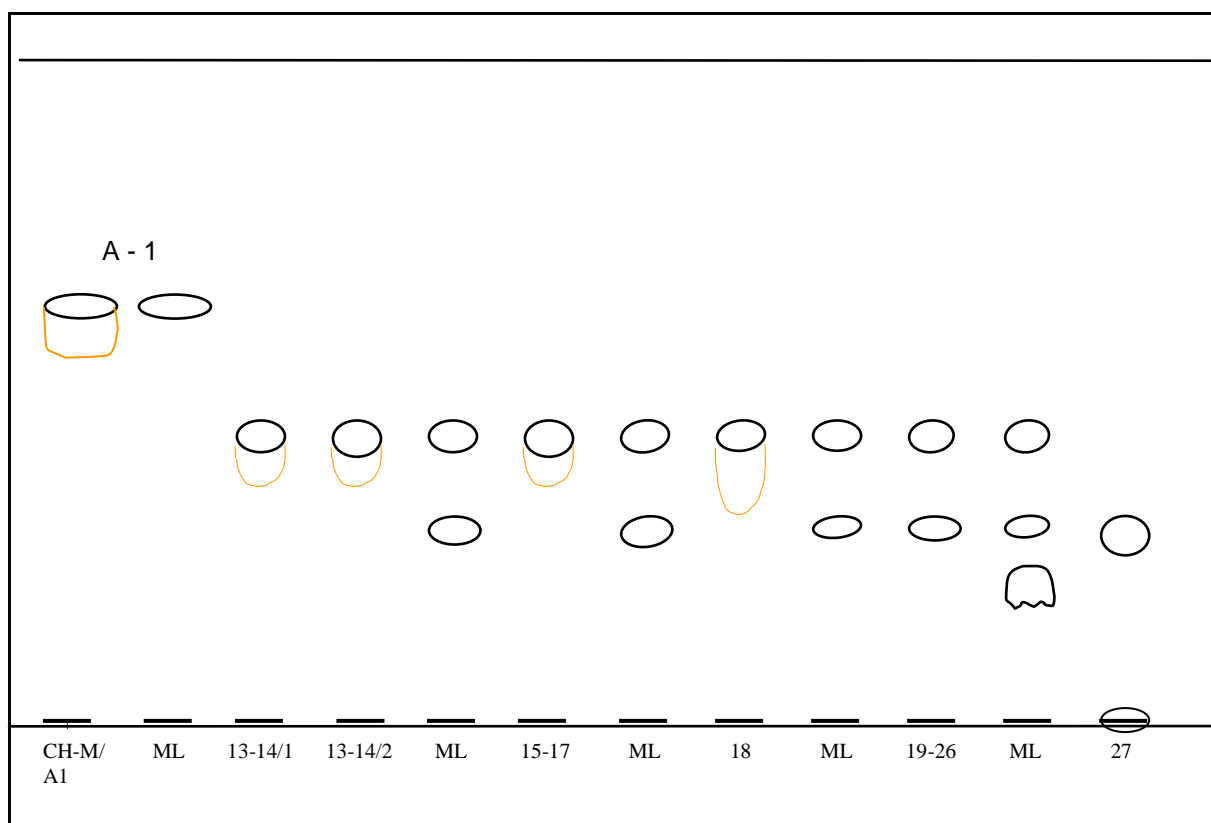


CH-M/A-1: $R_F=0,64$

ML: $R_F=0,64$ (CH-M/A-1)

Obr. 3: TLC jednotlivých frakcí z výtřepku A

S 1, komora nasycená, vyvíjení 2x, D 1



CH-M/A-1: $R_F=0,64$

ML: $R_F=0,64$ (CH-M/A-1)

4.4.5. Dělení jednotlivých frakcí

Čištění fr. 11

Frakce byla rozpuštěna v malém množství chloroformu, přidán ethanol a bylo ponecháno krystalizovat. Asi po 3 dnech se vyloučily drobné krystalky, ty byly odfiltrovány na fritě, promyty 2x směsí chloroform+ethanol 1:1 a krystaly vysušeny ve vakuu. Vzniklo 10,4 mg jemně nažloutlých jehličkovitých krystalů látky CH-M/A-1.

Čištění fr. 12

Po rozpuštění 270 mg odparku ve směsi chloroform+ethanol 1:1 se po 3 hodinách vyloučil drobně krystalický téměř bílý podíl, ten byl odsát, promyt 2x směsí chloroform+ethanol 1:1 a vysušen v exsikátoru nad silikagelem (n=29,2 mg) a matečný louh zpracován preparativní TLC.

Vyloučené krystaly z fr. 11 a 12 byly identické (CH-M/A-1) a byly k nim přidány i krystaly z preparativní TLC frakce 12, označené jako „A vyšší“.

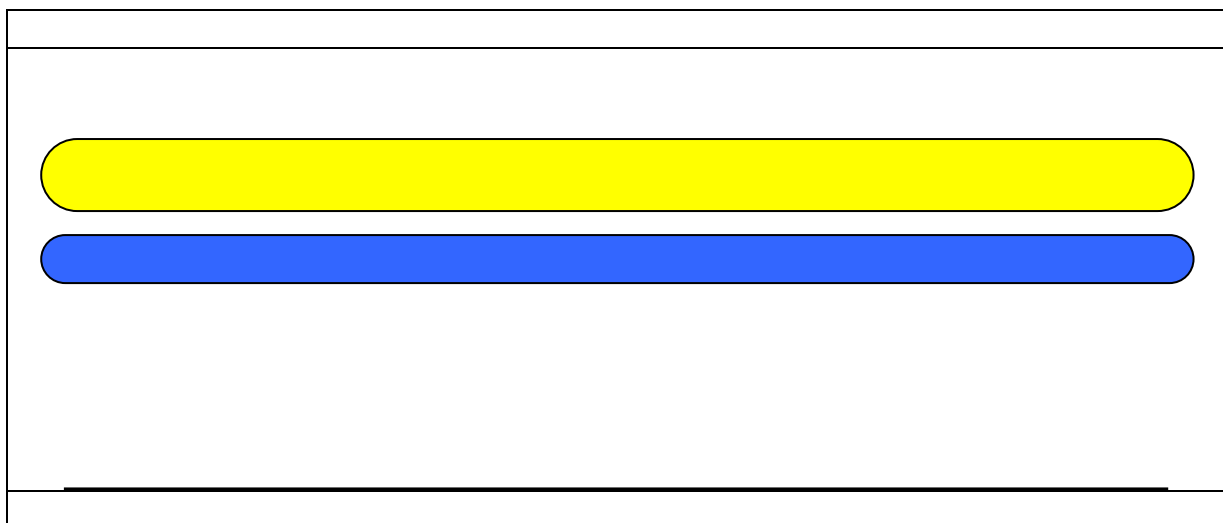
4.4.6. Preparativní TLC ML frakce 12

Tabulka 7: Preparativní TLC matečného louhu z fr. 12

Hmotnost frakce:	212 mg žlutého odparku bylo rozpuštěno ve 3,5 ml směsi chloroform+ethanol 1:1
TLC desky	Silufol UV 254 nm, 15x7,5 cm, nanášeno v pruhu 13 cm
Počet desek	34
Soustava:	Cyklohexan+diethylamin 9+1, komora nasycená, vyvíjení 2x

Obr. 4: Preparativní TLC ML z frakce 12

S 1, komora nasycená, vyvíjení 2x, D 3



Byly detekovány dvě zóny: *A nižší* ($R_f=0.45$) – látky CH-A/A-3, *A vyšší* ($R_f=0.62$) – látky CH-A/A-1. Zóny s adsorbentem byly vyškrabány, dále zpracovány:

Tabulka 8: Výsledky preparativní TLC ML z frakce 12

Zóna	Rozpouštědlo použité k vymytí látek z adsorbentu	Vzhled	Hmotnost
<i>A nižší</i> CH-A/A-3	50 ml chloroformu 50 ml $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ 1:1	Olejovitý, nahnědlý	77,7 mg, nejprve nekrystalizující, až po několika týdnech
<i>A vyšší</i> CH-A/A-1	50 ml chloroformu 50 ml $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ 1:1	Žlutavý s krystaly	70,5 mg, po krystalizaci 14,8 mg bělavý, krystal.

Olejovité odparky byly rozpuštěny v malém množství chloroformu, přidán ethanol do zákalu a ponechány krystalizovat.

Čištění *A vyšší*

Po několika dnech se vyloučily shluky drobných krystalků, suspenze byla odsáta, krystalky na fritě promyty 2x směsí chloroform+ethanol 1:1 a krystaly vysušeny ve vakuu. Vzniklo 14,8 mg bělavých krystalků.

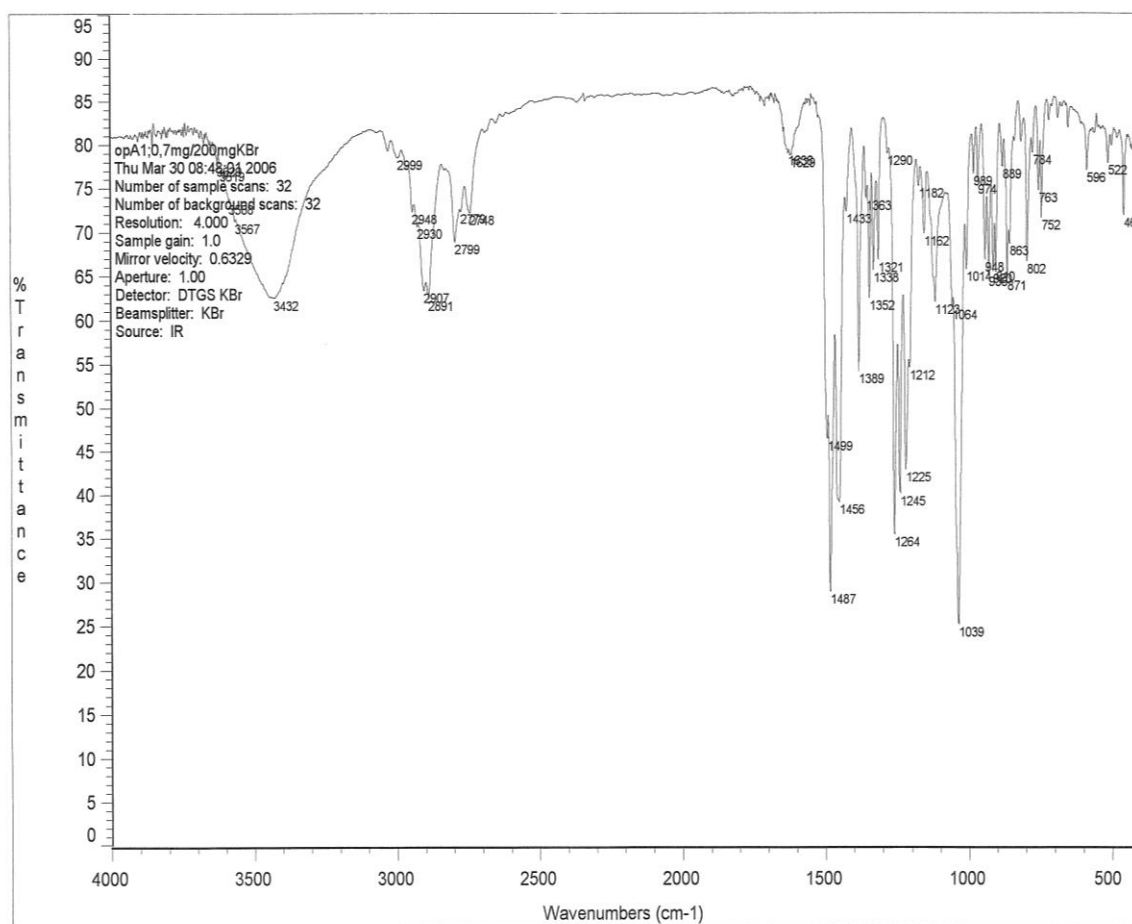
4.5. PŘEHLED IZOLOVANÝCH LÁTEK

V průběhu chromatografie byly izolovány jemně nažloutlé jehličkovité krystaly látky CH-M/A-1.

4.5.1. Teplota tání a IČ spektrum

Byla stanovena teplota tání této látky (198-204°C) a IČ spektrum.

Obr. 4: IČ spektrum CH-M/A-1



4.5.2. Výsledky biochemické části

Tabulka 9: Výsledky testu vlivu izolované látky na aktivitu AChE

Látka	IC ₅₀ [mg/l]	95% konfidenční interval [mg/l]	směrnice
CH-M/A-1	54.8	45.5 - 66.0	1.39

Z výsledků testu vlivu na AChE vyplývá, že inhibiční vliv látky na aktivitu AChE je velmi malý. Tuto hodnotu IC₅₀ musíme ale považovat za předběžnou, protože nebyla dosud stanovena struktura látky. Z hodnot t. t. se dá pouze odhadnout o jaké typy alkaloidů by se mohlo jednat: (-) stylopin (t. t. 201 – 202 °C), chelamin (t. t. 203 – 204 °C), tetrahydrocorysamin (t. t. 201 – 202 °C).

5. DISKUSE

Léčba AD je velmi problémovou a svízelnou záležitostí. AD je totiž komplexem řady patologicko-fyziologických procesů, z nichž některé na sebe navazují a některé působí separátně. V současné době je hlavním terapeutickým zásahem zásah do aktivity mozkové AChE. Řada sloučenin má cholinomimetické účinky velmi příznivé, ale bohužel prakticky nevyužitelné. Tyto účinky jsou nejen centrální, ale i periferní a právě látky, které mají výrazné periferní účinky jsou nepoužitelné.

Z přírodních látek přichází v úvahu jen několik málo sloučenin; v současné době začíná být využíván pouze galanthamin, velmi intenzivně se pracuje na různých galanthaminových derivátech.³³ Fysostigmin, který je výrazným cholinomimetikem je těžko použitelný, protože má výrazné vedlejší účinky. Další velmi perspektivní přírodní látkou je alkaloid izolovaný z některých zástupců čeledi Lycopodiaceae – Huperzin A. Podává se v podstatně nižších dávkách než galanthamin, jeho dosažitelnost je však v současné době poněkud obtížnější než u jiných přírodních látek. Nicméně rozsáhlé syntetické studie ukazují, že tato látka bude přístupná totální syntézou.³⁴ Tato látka je velkou nadějí, protože syntetické látky v současnosti používané (donepezil, takrin) nenaplnují terapeutické potřeby našich představ. Takrin je v této době už léčivem obsolentním.

Z těchto důvodů probíhá intenzivní výzkum jak syntetických, tak přírodních látek s ohledem na jejich schopnost reverzibilně brzdit rozklad mozkové AChE. Jako velmi nadějně se kromě různých syntetických látek ukazují i některé další látky: zeatin (*Fiatoua villosa*, Orchidaceae, *Zea mays*, Poaceae), dehydroevodiamin (*Evodia rutaecarpa*, Rutaceae), (+)-homomoenjadaramin, moenjadaramin (*Buxus hyrcana*, Buxaceae), cykloprotobuxin C, cyklovirobuxein A, cyklomikrofilin A (*Buxus papillosa*, Buxaceae) a další.²² Z hlediska preparativního jsou atraktivní alkaloidy, a to tím, že se s nimi podstatně lépe pracuje než s neutrálními sloučeninami (lze je rychleji a méně nákladně čistit).

Jedna z rostlin, u kterých se vyskytly alkaloidy biologicky aktivní vůči AChE, je vlašovičník větší, *Chelidonium majus*. Jak nať, tak kořeny obsahují základní 4 typy alkaloidů: benzophenantridinový, protoberberinový, protopinový, aporfinový. Jeho výzkum se v poslední době poměrně rozšiřuje patrně z důvodu antineoplastického účinku alkaloidního přípravku nazývaného Ukrain (preparát obsahuje extrakt alkaloidů z *Chelidonium majus* konjugovaných s kyselinou thiofosforečnou).²⁵ V souvislosti s tímto studiem je však studována řada alkaloidů i na jiné účinky, např.

efekt benzofenantridinových alkaloidů na lidské keratinocyty²⁶ inhibice 5- a 12-lypoxigenázy neredoxním mechanismem²⁷ a další.

V poslední době je věnována také pozornost vlivu vlaštovičnickových alkaloidů na hydrolýzu acetylthiocholinu a acetylcholinesterázu (také podobných alkaloidů izolovaných z *Bocconia cordata*³⁵) zejména chelidoninu, sanguinarinu, chelerythrynu a také Ukrainu.

Ukázalo se, že benzo[c]fenantridinové alkaloidy (sanguinarin, chelerythrin) jsou poměrně účinné ($IC_{50} = 0,2 - 0,3$ mM). Zajímavý účinek však ukazuje také chelidonin a Ukrain ($IC_{50} = 2 - 2,5$ mM).

V souvislosti se screeningem přírodních látek typu alkaloidů z čeledi Papaveraceae a Fumariaceae, který je prováděn na katedře farmaceutické botaniky a ekologie, byl proveden pokus o izolaci alkaloidů, s cílem podrobit tyto látky testování vlivu na mozkovou AChE a v pozdější době na prolylendopeptidázu. K této izolaci bylo použito 41,8 kg celé usušené rostliny (nať a kořeny). Izolační postup byl použit, jak je uvedeno v literatuře prof. Slavíkem³⁶, jehož pracovní skupina se alkaloidy z čeledi Papaveraceae (pouze z preparativního hlediska) zabývala od padesátých do sedmdesátých let minulého století. Pro tyto izolace používala pracovní skupina sofistikovanou a velice logickou metodu: rostlinná část byla extrahována methanolem nebo ethanolem. Po odstranění rozpouštědel byl odparek roztřepán se slabým roztokem kyseliny sírové a filtrován. Prakticky neutrální alkaloidy a neutrální znečištění byly odstraněny vytřepáním tohoto roztoku etherem. Vodná vrstva byla zalkalizována uhličitanem sodným (pH 9-10), vyloučené alkaloidy vytřepány etherem, zbylá vodná vrstva zalkalizována na pH 12-12,5 a silné báze vytřepány opět do etheru. Po okyselení vodného extraktu kyselinou chlorovodíkovou a přidavkem jodidu draselného byly vytvořené jodidy kvarterních bazí vytřepány chloroformem (jodidy kyselé) a kyselý vodný roztok byl opět zalkalizován amoniakem a vytřepán chloroformem do něhož přešly jodidy bazické. Etherový výtřepek, který byl získán alkalizací uhličitanem sodným obsahoval středně bazické alkaloidy. Byl dále separován přípravou ps-kyanidů (sanguinarinové báze vytvářejí ps-kyanidy). Zbylý roztok po ps-kyanidech byl zpracován s koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na chloridy rozpustné ve vodě a chloridy ve vodě nerozpustné. Nakonec byly z těchto frakcí odděleny chloridy fenolické od nefenolických. Postup je velmi logický a historicky patrně osvědčený. Bohužel se však ukázalo, že v našich podmínkách nepřináší vůbec tak slavné výsledky jak popisuje Slavíkova skupina (jednotlivým

vytřepáváním a frakční krystalizací rozdělila tato skupina látky až do čistého stavu). Zjistili jsme, že opakováním tohoto postupu je výsledek nereálný. Po odstranění málo bazických alkaloidů a ostatních znečištěnin z kyselého roztoku alkaloidů (31 g odparku A) byly připraveny ps-kyanidy (1,46 g), byly separovány chloridy ve vodě rozpustné a ve vodě nerozpustné. My jsme se věnovali dělení alkaloidů, jejichž chloridy jsou ve vodě rozpustné.

Zjistili jsme, že Slavíkem popisovaný postup nepřinesl tak výborné výsledky³⁶. Autor krystalizoval baze různým způsobem z chloroform-methanolu, přičemž získal z nati racemát stylopinu (t. t. 221 – 222°C), (-) stylopin (t. t. 201 – 202°C), chelidonin (t. t. 135 – 136°C), protopin (t. t. 203 – 204°C). Řadu dalších alkaloidů získal stejným postupem z kořene. V našem případě je situace zkomplikována tím, že jsme použili celou rostlinu, protože nám byla nabídnuta zahraniční firmou.

Předpokládali jsme, že se nám podaří větší množství alkaloidů Slavíkovým postupem rozdělit. Náš předpoklad se ukázal bohužel mylný a z tohoto důvodu musíme čekat na výsledky spektrální analýzy, která odhalí strukturu izolovaných látek.

Látka CH-M/A-1 měla t. t. 198 – 204 °C (Kofler). TLC ukázala, že alkaloid připravený naším postupem (sloupcová chromatografie na oxidu hlinitém z frakce 11 a 12), je čistý. Na konečné ověření struktury musíme vyčkat až po provedení spektrálních analýz.

Dále byla tato látka podrobena testu na vliv aktivity AChE. Stanovení aktivity enzymu je založeno na jeho reakci s nativním substrátem, který je štěpen na alkohol cholin a kyselinu octovou. Ta je při použití pH-konstantní instrumentace neutralizována kontinuálními přídávky roztoku hydroxidu sodného tak, aby bylo udrženo konstantní pH 8. Výsledek tohoto testu ukazuje, že inhibiční vliv látky CH-M/A-1 na AChE je velmi malý ($IC_{50} = 54,8$ mg/l). Tento výsledek musíme ale považovat pouze za předběžný, protože IC_{50} nebylo možné stanovit z důvodu prozatimní neznalosti struktury látky. V budoucnu bude také použita pozitivní kontrola galanthamin a neostigmin, která v současné době použita nebyla. Tato metoda nebyla dosud propracována a některé kroky je třeba upravit.

6. SOUHRN

Z 41,8 kg celé usušené rostliny byly získány jednotlivé výtřepky. Extrakce byla provedena společně s dalšími diplomantkami Janou Nagyovou, Evou Vítkovou a Dagmar Kubincovou. Z výtřepku A, (182,0 g; světlé medové barvy, vysoce viskózní, nekystalizující) pak byly získány alkaloidy ve vodě rozpustné (5,0737 g; světle nažloutlý, hrubě krystalický).

Dále náš postup pokračoval sloupcovou chromatografií, kde byly získány jednotlivé frakce. Já jsem se věnovala frakci 11 a 12 (žlutá s krystalky), ze kterých byla izolována látka CH-M/A-1. Přičemž přečištěním frakce 11 bylo získáno 10,4 mg jemně nažloutlých jehličkovitých krystalů a z frakce 12 29,2 mg jemně nažloutlých jehličkovitých krystalů. Z matečného louhu frakce 12 bylo pomocí preparativní TLC získáno ještě dalších 14,8 mg téže látky.

Byla stanovena teplota tání izolované látky (198 – 204 °C) a IČ spektrum.

Na konci naší práce byl určen inhibiční vliv izolované látky na aktivitu AChE. IC_{50} má hodnotu 54,8 mg/l. Tento výsledek je pouze předběžný, protože není dosud známa struktura látky. Nicméně tato hodnota předběžně ukazuje velmi malý inhibiční vliv na AChE a jako inhibitor při AD by tato látka neměla využití.

LITERATURA

-
- ¹ www.zdravi.doktorka.cz/homocystein-spolecny-jmenovatel-civilizacnich/ (30. 4. 2006).
 - ² Pydychová, E.: Alzheimerova nemoc. Solutio, 2002/2003, 21-30 (2002).
 - ³ www.pharmanews.cz/2005_05/alzheimer.htm (30. 4. 2006)
 - ⁴ Koukolík, F., Jiráček R.: Alzheimerova nemoc a další demence. Grada Publishing, Praha 1998, s. 213-229.
 - ⁵ Giacobini, E.: Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. Neurochem Res. 28(3-4), 515-22 (2003).
 - ⁶ Greig, N. H., Lahiri, D. K., Sambamurti, K.: Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. Int Psychogeriatr. 14(1), 77-91 (2002).
 - ⁷ Abe, Y., Aoyagi, A., Hara, T., Abe, K., Yamazaki, R., Kumagae, Y., Naruto, S., Koyama, K., Marumoto, S., Tago, K., Toda, N., Takami, K., Yamada, N., Ori, M., Kogen, H., Kaneko, T.: Pharmacological characterization of RS-1259, an orally active dual inhibitor of acetylcholinesterase and serotonin transporter, in rodents: possible treatment of Alzheimer's disease. J Pharmacol Sci. 93(1), 95-105 (2003).
 - ⁸ Toda, N., Tago, K., Marumoto, S., Takami, K., Ori, M., Yamada, N., Koyama, K., Naruto, S., Abe, K., Yamazaki, R., Hara, T., Aoyagi, A., Abe, Y., Kaneko, T., Kogen, H.: A conformational restriction approach to the development of dual inhibitors of acetylcholinesterase and serotonin transporter as potential agents for Alzheimer's disease. Bioorg Med Chem. 11(20), 4389-415 (2003).
 - ⁹ Houghton, P.; Howes, M. J.: Natural Products and Derivatives Affecting Neurotransmission Relevant to Alzheimer's and Parkinson's Disease. Pharmacognos. Res. 14(1-2), 6-22 (2005).
 - ¹⁰ Mills, C., Cleary, B. J., Gilmer, J. F., Walsh, J. J.: Inhibition of acetylcholinesterase by Tea Tree oil. J Pharm Pharmacol. 56(3), 375-9 (2004).

-
- ¹¹ Orhan, I., Terzioglu, S., Sener, B.: Alpha-onocerin: an acetylcholinesterase inhibitor from *Lycopodium clavatum*. *Planta Med.* 69(3), 265-7 (2003).
- ¹² Lamirault, L., Guillou, C., Thal, C., Simon, H.: (-)-9-Dehydrogalanthaminium bromide, a new cholinesterase inhibitor, enhances place and object recognition memory in young and old rats. *Neurobiol Learn Mem.* 80(2), 113-22 (2003).
- ¹³ Wang, L. S., Zhou, J., Shao, X. M., Tang, X. C.: Huperzine A attenuates cognitive deficits and brain injury after hypoxia-ischemic brain damage in neonatal rats. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 41(1), 42-5 (2003).
- ¹⁴ Zangara, A.: The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav.* 75(3), 675-86 (2003).
- ¹⁵ Kelly, S. A., Foricher, Y., Mann, J., Bentley, J. M.: A convergent approach to huperzine A and analogues. *Org Biomol Chem.* 1(16), 2865-76 (2003).
- ¹⁶ Jin, G., Luo, X., He, X., Jiang, H., Zhang, H., Bai, D.: Synthesis and docking studies of alkylene-linked dimers of (-)-huperzine A. *Arzneimittelforschung* 53(11), 753-7 (2003).
- ¹⁷ Zaheer-UI-Haq, Z. U., Wellenzohn, B., Liedl, K. R., Rode, B. M.: Molecular docking studies of natural cholinesterase-inhibiting steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna*. *J Med Chem.* 46(23), 5087-90 (2003).
- ¹⁸ Chung, Y. K., Heo, H. J., Kim, E. K., Kim, H. K., Huh, T. L., Lim, Y., Kim, S. K., Shin, D. H.: Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L. on the acetylcholinesterase. *Molecules and Cells* 11(2), 137-143 (2001).
- ¹⁹ Kim, D. S. H. L., Park, S.-Y., Kim, J.-Y.: Curcuminoids from *Curcuma longa* L.(Zingiberaceae) that protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from bA(1-42) insult. *Neuroscience Letters* 303(1), 57-61 (2001).
- ²⁰ Sung, S. H., Kang, S. Y., Lee, K. Y., Park, M. J., Kim, J. H., Park, J. H., Kim, Y. C., Kim, J., Kim, Y. C.: (+)-a-Viniferin, a stilbene trimer from *Caragana chamlague*, inhibits acetylcholinesterase. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 25(1), 125-127 (2002).

-
- ²¹ Kim, S. R., Hwang, S. Y., Jang, Y. P., Park, M. J., Markelonis, G. J., Oh, T. H., Kim, Y. C.: Protopine from *Corydalis ternata* has anticholinesterase and antiamnesic activities. *Planta Med.* 65(3), 218-221 (1999).
- ²² Opletal, L., Opletalová, V.: Současné uplatnění některých přírodních látek v terapii demencí Alzheimerova typu. Sborník abstraktů z 34. konference: Syntéza a analýza léčiv. Brno 12. – 14. 9. 2005, s. 26.
- ²³ Darvesh, S., Walsh, R., Martin, E.: Enantiomer effects of huperzine A on the aryl acylamidase activity of human cholinesterases. *Cell Mol Neurobiol.* 23(1), 93-100 (2003).
- ²⁴ Cordato, D. J., Mather, L. E., Herkes, G. K.: Stereochemistry in clinical medicine: a neurological perspective. *J Clin Neurosci.* 10(6), 649-54 (2003).
- ²⁵ Táborská, E., Bochořáková, H., Dostál, J., Paulová, H.: Vlaštovičník větší (*Chelidonium majus* L.) – přehled současného stavu poznatků. *Česká a slovenská farmacie.* 44(2), 71-75 (1995).
- ²⁶ Vavreckova, C., Gawlik, I., Mueller, K.: Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*. Part 2. Potent inhibitory action against the growth of human keratinocytes. *Planta Med.* 62(6), 491-494 (1996).
- ²⁷ Vavreckova, C., Gawlik, I., Mueller, K.: Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*. Part 1. Inhibition of 5- and 12-lipoxygenase by non-redox mechanism. *Planta Med.* 62(5), 397-401 (1996).
- ²⁸ Jirásek, V., Starý, F.: Atlas léčivých rostlin. SPN, Praha 1986, s. 108.
- ²⁹ Blaschek, W., Ebel, S., Hackental, E., Holtzgrabe, U., Kellner, K., Reichling, J., Schnetz, V. et. al.: Hager ROM 2004: Hager's Handbuch der Drogen und Arzneistoffe. Springer & Info II Uni. Würzburg, Würzburg 2005.
- ³⁰ Stahl, E.: Thin-Layer Chromatography. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1969, s. 873.
- ³¹ Československý lékopis, vydání čtvrté, díl první, Avicenum, Praha 1987, s.361.

-
- ³² Kuča, K., Cabal, J., Patočka, J., Dohnal, V.: Quaternary heteroarenium salts as the competitive inhibitors of the brain acetylcholinesterase. *Letters in drug design and discovery* 1, 97-100 (2004).
- ³³ Bores, G. M., Kosley, R. W. Jr.: Galanthamin derivatives for treatment of Alzheimer's diseases. *Drugs Fut.* 21(6), 621-635 (1996).
- ³⁴ Tang, X. C., He, X. C., Bai, D. L.: Huperzin A: A novel acetylcholinesterase inhibitor. *Drugs Fut.* 24(6), 647-663 (1999).
- ³⁵ Kuznetsová, L. P., Nikol'skaya, E. B., Sochilina, E. E., Fadeeva, M. D.: Inhibition of enzymatic hydrolysis of acetylcholin with acetylcholinesterase by principal alkaloids isolated from *Chelidonium majus* and *Macleaya* and by derivate drugs. *Tsitologiya* 43(11), 1046-1050 (2001).
- ³⁶ Slavík, J.: Alkaloidy rostlin mákovitých (*Papaveraceae*) I., Látky z vlaštovičníku (*Chelidonium majus* L.). *Československá farmacie* 1, 15-17 (1954).

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Biologická aktivita obsahových látek rostlin V. Vliv alkaloidů z *Chelidonium majus* L. na acetylcholinesterázu“ vypracovala samostatně s konzultací mého školitele. Použité prameny jsou uvedeny v literárních odkazech.

V Hradci Králové 15.5.2006

.....
Šárka Brožová